

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E  
MUCURI**

**CÁTIA DA CRUZ SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS ELETROQUÍMICAS  
FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO POLI(4-AMINOBENZÓICO)  
APLICADAS EM BIOSSENSORES**

**DIAMANTINA – MG  
2014**

**CÁTIA DA CRUZ SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS ELETROQUÍMICAS  
FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO POLI(4-AMINOBENZÓICO)  
APLICADAS EM BIOSSENSORES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira - UFVJM

**DIAMANTINA – MG  
UFVJM  
2014**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

S237d	<p>Santos, Cátia da Cruz</p> <p>Desenvolvimento de plataformas eletroquímicas funcionalizadas com ácido poli(4-aminobenzóico) aplicadas em biossensores / Cátia da Cruz Santos. – Diamantina: UFVJM, 2014.</p> <p>107 p. : il.</p> <p>Orientador: Lucas Franco Ferreira</p> <p>Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Ácido 4-aminobenzóico. 2. Eletropolimerização. 3. filmes poliméricos. 4. DNA, peptídeo. 5. medidas de impedância. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;"><b>CDD 661</b></p>
-------	--

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS ELETROQUÍMICAS  
FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO POLI(4-AMINOBENZÓICO)  
APLICADAS EM BIOSSENSORES**

**CÁTIA DA CRUZ SANTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Química.

APROVADA em 27/02/2014.

---

Prof. Dr. Diego Leoni Franco - IQ/UFU - Patos de Minas

---

Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly - DEQUI/UFVJM

---

Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira - ICT/UFVJM  
Presidente

DIAMANTINA – MG  
2014

## **DEDICATÓRIA**

A Deus,  
porque dEle e por Ele,  
para Ele são todas as coisas...

Aos meus pais,  
Fenilza e Carleno,  
com quem compartilho esta conquista,  
obrigada pelo amor incondicional, constante apoio,  
dedicação, compreensão e confiança.

Às minhas queridas irmãs,  
Cássia e Carla,  
pela amizade sincera,  
companheirismo e torcida.

Aos demais familiares,  
pelo incentivo e  
por torcerem por mim!

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus,*

Meu porto seguro, por ser refúgio e fortaleza em todos os momentos, pelo cuidado em todo o tempo e por essa vitória em minha vida. Sem Ti eu nada poderia!

*Aos meus pais,*

Pelo amor proporcionado, por toda dedicação em buscar sempre o melhor para a minha vida. Pelos conselhos dados, ensinamentos e pela compreensão em todos os momentos. Amo vocês pra sempre!

*Às minhas irmãs,*

Por torcerem sempre por mim, pelos momentos maravilhosos proporcionados durante as férias em casa e pela força nos momentos de dificuldade, tristeza e solidão. Eu amo vocês!

*Ao Gustavo,*

Pelo apoio, incentivo, paciência, compreensão e por me ouvir sempre que precisei... sua companhia enche a minha vida de alegria! Obrigada por estar ao meu lado sempre!

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira,*

Pela sua indispensável orientação, pelo profissionalismo, caráter, paciência, pela confiança depositada e, sobretudo por sua disponibilidade durante todas as etapas de realização deste trabalho e por tantos ensinamentos que contribuíram para o desenvolvimento do mesmo. Enfim, agradeço pela oportunidade de construir conhecimentos fundamentais para a minha vida acadêmica, por acreditar em mim e pela amizade e dedicação proporcionadas.

*Ao Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly,*

Pelas amostras de peptídeo concedidas, pela excelente colaboração, paciência e disposição demonstradas durante a execução deste trabalho.

*Ao Prof. Dr. Leonardo Moraes da Silva,*

Pela colaboração, esclarecimento das questões de espectroscopia de impedância eletroquímica, referentes a este trabalho e sugestões que contribuíram para a melhoria e aprimoramento do trabalho desenvolvido.

*A todos os professores do Departamento de Química,*

Pelos ensinamentos transmitidos que contribuíram para a minha formação e pelas contribuições significativas no decorrer deste trabalho.

*Ao Grupo de Eletroquímica e Nanotecnologia Aplicada (GENAp),*

Em especial ao Filipe Cruz, companheiro de trabalho, sou muito grata pela sua colaboração em permitir-me acompanhá-lo no início da pesquisa para que a execução deste trabalho fosse possível.

*À minha amiga Fátima,*

Pelo companheirismo, convivência, pelas risadas e conversas. E à Isabel Torres, pela amizade, motivação e companhia nas madrugadas de estudo e resolução das enormes provas. Obrigada por serem minhas amigas em todos os instantes!

*Ao Ricardo Correa,*

Que se tornou um amigo querido, obrigada pelo apoio, pelos momentos de alegria e descontração no laboratório. E pela disponibilidade em me ajudar sempre que foi necessário.

*Ao meu amigo, Fernando Mota,*

Pela demonstração de amizade, pelos momentos de conversa e companhia no laboratório e pelas resoluções das provas por telefone... rs!

*À minha amiga de república, Mariana Reis,*

Pela ótima convivência, pelas palavras de ânimo, conversas e pelos bons momentos compartilhados.

*Aos amigos de laboratório,*

Delton, Dilton, Ismael, Alexandre Xavier, Aline Nogueira, Maria Fernanda, Neiviane, Jussara e João Gabriel.

A todos os amigos que estiveram comigo desde a graduação e colegas do mestrado, pelos momentos felizes proporcionados, pelas risadas e pelo apoio nas disciplinas.

Aos amigos da Igreja Batista Central de Diamantina e da IBPC de Taiobeiras, pela amizade e comunhão.

Aos membros da banca que aceitaram participar e contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À UFVJM, pela oportunidade de realização deste trabalho e pelos anos de formação profissional.

A todos que sempre estiveram ao meu lado torcendo pelo sucesso deste trabalho,

*Muito obrigada!*

*"Haverá dias sem respostas, noites longas também, mas o regente de  
todas as coisas compõe uma nova canção no silêncio."*

(Bianca Toledo)

*Que a sua felicidade esteja no Senhor! Ele lhe dará o que o seu coração  
deseja!*

(Salmos 37.4)



## RESUMO

Neste trabalho foi investigada a eletropolimerização do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), visando sua aplicação como plataforma funcionalizada para imobilização de biomoléculas, para o desenvolvimento de sensores biológicos. Foi utilizado o monômero 4-ABA, e por meio deste a eletrogeração foi conduzida sobre a superfície do eletrodo de grafite (EG), utilizando-se as técnicas de voltametria cíclica (VC) e cronoamperometria (CA), onde nesta, foi investigado o tempo de eletrodeposição. Associado a este estudo, foi investigado a imobilização de pequenos fragmentos de DNA (oligonucleotídeos), observando a atuação da plataforma funcionalizada na resposta do biossensor em relação à detecção dos oligonucleotídeos, bem como avaliação do reconhecimento do evento de hibridização, com o alvo complementar. Para a VC, os EG foram modificados com 100 ciclos consecutivos de potencial, em velocidade de varredura de 50 mV/s, na faixa de potencial de +0,00 a +1,20 V, enquanto que na CA, os EG foram modificados nos potenciais de +0,95 V; +1,05 V e +1,15 V, onde tempo de polimerização foi investigado em 4800 segundos e 2400 segundos. Observou-se que dentre os três potenciais pré-estabelecidos, o que apresentou maior eletroatividade, foi no eletrodo modificado à +1,05 V, seguido dos potenciais de +1,15 V e +0,95 V, respectivamente. Para o filme formado em +0,95 V, há um ligeiro aumento da corrente na atividade do par redox, sendo também observado que um maior deslocamento de potencial e corrente, ocorreu para o eletrodo modificado em +1,05 V seguido do potencial +1,15 V. A atividade eletroquímica dos filmes poliméricos é praticamente da mesma magnitude quando a eletropolimerização por CA, ocorre a 4800 segundos e 2400 segundos. O eletrodo que apresentou as melhores respostas para imobilização e detecção das bases púricas, guanina e adenina, foi o eletrodo modificado por VC, seguido do eletrodo modificado no potencial de +1,05 V, uma vez que mostrou-se maiores amplitudes nos valores de corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) dentre os potenciais constantes. Os filmes formados a 2400 segundos apresentam menor sensibilidade para a imobilização e detecção da guanina, biomarcador. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) mostraram maior resistência à transferência de carga ( $R_{tc}$ ) para o eletrodo modificado no potencial +1,05 V, seguido do eletrodo modificado por VC. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que em todos os casos não há total recobrimento da superfície do EG. Para o poli(4-ABA) eletropolimerizado por VC, as imagens de MEV mostraram morfologia completamente distinta, pois se observa uma maior cobertura da superfície do grafite, quando comparado aos filmes poliméricos formados por CA. É nítido que para os filmes formados a 4800 segundos, há maior presença de material depositada para a plataforma desenvolvida em +1,05 V. A plataforma Poli(4-ABA)/EG mostrou-se eficiente e sensível para a imobilização do oligonucleotídeo (poliGA), bem como a detecção do evento de hibridização com o oligonucleotídeo complementar (poliCT). A ssDNA apresentou melhor afinidade pelo azul de metileno (AM) devido aos pares de bases da guanina presentes na sonda, comparada a dsDNA, onde a formação do híbrido diminui o acesso de intercalação do azul de metileno (AM) às bases guanina, enquanto que a resposta eletroquímica do brometo de etídio (BE) foi melhor observada na dsDNA. Estudos da imobilização do peptídeo DD K, com o alvo específico (fosfolípídeo POPC), e o alvo não específico (fosfolípídeo POPC + colesterol), mostraram-se bastante promissores. A imobilização do peptídeo sobre o poli(4-ABA) não gerou grandes alterações no perfil dos espectros de EIE. Foi possível observar uma semelhança entre os diagramas de Bode para as medidas da sonda e da sonda + alvo específico devido à forte interação existente entre peptídeo/LUVs sem colesterol. Contudo, para o eletrodo contendo a sonda + alvo não específico (LUVs com colesterol), o espectro foi alterado. Tais resultados indicam promissora aplicação da plataforma desenvolvida no reconhecimento de alvos biológicos, bem como o desenvolvimento de biossensores.

**Palavras-chave:** ácido 4-aminobenzóico, eletropolimerização, filmes poliméricos, DNA, peptídeo, medidas de impedância.

## ABSTRACT

The electropolymerization of 4-aminobenzoic acid (4-ABA) on graphite electrodes (GE) was investigated for the development of electrochemically functionalized platforms applied in the immobilization of biomolecules. The electrogeneration of 4-ABA was carried out in perchloric acid solutions using cyclic voltammetry (CV) and chronoamperometry (CA) techniques. In the case of CV studies, the GEs were modified by applying 100 consecutive potential cycles, while in the case of CA studies the electrodes were modified at different potentials ( $E/V$  vs.  $Ag/AgCl$ ): +0.95, +1.05 and +1.15. The modified GEs were characterized using CV and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) techniques in  $HClO_4$  solutions in the presence and absence of the ferricyanide/ferrocyanide redox couple (redox probe). Scanning electron microscopy (SEM) was used for morphological characterization. In case of CA, the best electrochemical activities for the electropolymerization reaction were verified at +1.05 V > +1.15 V > +0.95 V. The poly(4-ABA) platforms were investigated for the immobilization and direct detection of purine bases (adenine and guanine), where the higher values of the anodic peak current ( $I_{p,a}$ ) were observed for the transducers electroformed using CV. For immobilization of oligonucleotides poly(GA) and recognition of hybridization event with the complementary target poly(CT), methylene blue (MB) and ethidium bromide (EB) were used as indicator and intercalator, respectively. MB was reduced at  $-0.26$  V resulting in the cathodic peak current ( $I_{p,c}$ ) for the ssDNA, while in the case of EB the oxidation was observed at  $+0.58$  V thus resulting in the higher values of  $I_{p,a}$  for the dsDNA. The platforms were also evaluated for immobilization of the DD K peptide, whose antibacterial activity and biological recognition were verified using the complementary (phospholipid 1- palmitoyl - 2 - oleoyl phosphatidylcholine - POPC) and non-complementary (phospholipid POPC + cholesterol) targets. The recognition mechanism was monitored using impedance measurements, where it was verified a good interaction of the peptide DD K with the POPC mimetic membrane. In addition, the interaction was affected by the presence of cholesterol, thus revealing that the use of poly(4-ABA) platforms is very promising for the development of biosensors.

**Keywords:** 4-aminobenzoic acid; electropolymerization; polymeric films; DNA; peptide; impedance measurements.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema representativo de um biossensor. ....	4
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo das quatro principais técnicas de imobilização de biomoléculas. (a) adsorção física, (b) ligação covalente, (c) oclusão, (d) ligação cruzada. ....	10
<b>Figura 3:</b> Estrutura química do 4-ABA. ....	12
<b>Figura 4:</b> Potenciostato/Galvanostato da AUTOLAB PGSTAT 128N, utilizado para as medidas eletroquímicas. ....	19
<b>Figura 5:</b> Célula eletroquímica utilizada nos experimentos de eletropolimerização. ....	20
<b>Figura 6:</b> Microscópio de Bancada da Hitachi High Technologies modelo TM-3000. ....	20
<b>Figura 7:</b> Ultrapurificador de água PURELAB Classic DI (ELGA) utilizado para ultrapurificação da água utilizada nos experimentos. ....	21
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática das etapas de preparação dos lipossomas. ....	24
<b>Figura 9:</b> Procedimento de preparação dos eletrodos de grafite. ....	25
<b>Figura 10:</b> VC do eletrodo de grafite não modificado em: (A) solução $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,00 mM contendo KCl 0,10 M e (B) solução $HClO_4$ 0,50 M. $\nu = 100$ mV/s. ....	32
<b>Figura 11:</b> VC em solução 2,50 mM de 4-ABA sobre eletrodo de grafite. Eletrólito suporte: $HClO_4$ 0,50 M. $\nu = 50$ mV/s. ....	34
<b>Figura 12:</b> VCs consecutivos do eletrodo de grafite em solução de 0,50 M de ácido perclórico. Número de ciclos = 10; $\nu = 50$ mV/s. ....	34
<b>Figura 13:</b> VCs consecutivos do eletrodo de grafite em solução de 2,50 mM de 4-ABA. Eletrólito suporte: $HClO_4$ 0,50 M. Número de ciclos = 100; $\nu = 50$ mV/s. Sendo: (—) 1º ciclo de potencial. As setas indicam o sentido da corrente. ....	35
<b>Figura 14:</b> VC do eletrodo de Poli(4-ABA)/EG após eletropolimerização, somente em solução de $HClO_4$ 0,50 M, para a remoção do monômero residual. Sendo: (—) 1º ciclo de potencial e (----) 2º ciclo de potencial. $\nu = 100$ mV/s. ....	37
<b>Figura 15:</b> VC obtido após a eletropolimerização, somente em solução de ácido perclórico 0,50 M, na ausência do monômero, para os eletrodos de grafite: (---) eletrodo não-modificado	

e (—) modificado com poli(4-ABA).  $\nu = 100$  mV/s. ....37

**Figura 16:** VCs obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica dos eletrodos de grafite em solução aquosa de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5,0 mM contendo KCl 0,10 M: (---) eletrodo não-modificado e (—) modificado com poli(4-ABA).  $\nu = 100$  mV/s. ....38

**Figura 17:** VCs obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica dos eletrodos de grafite em solução de KCl 0,10 M: (---) EG e (—) poli(4-ABA)/EG.  $\nu = 100$  mV/s. ....39

**Figura 18:** Cronoamperogramas obtidos para eletropolimerização dos EG em solução de 2,50 mM de 4-ABA. Eletrólito suporte:  $\text{HClO}_4$  0,50 M. Potenciais aplicados: (—) +0,95 V, (—) +1,05 V, (—) +1,15 V. Tempo: 4800 s. ....41

**Figura 19:** Cronoamperogramas obtidos a partir da eletropolimerização dos EG em solução de 2,50 mM de 4-ABA. Eletrólito suporte:  $\text{HClO}_4$  0,50 M. Potenciais aplicados: (—) +0,95 V, (—) +1,05 V, (—) +1,15 V. Tempo: 2400 s. ....42

**Figura 20:** VCs dos eletrodos modificados em solução de ácido perclórico 0,50 M. Sendo: (—) poli(4-ABA)/EG +0,95 V, (—) poli(4-ABA)/EG +1,05 V, (—) poli(4-ABA)/EG +1,15 V e (---) EG.  $\nu = 100$  mV/s. Onde (A) Tempo: 4800 s e (B) Tempo: 2400 s. ....43

**Figura 21:** VCs obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica para os eletrodos de grafite em solução aquosa de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5,0 mM contendo KCl 0,10 M. Sendo: (—) poli(4-ABA)/EG +0,95 V, (—) poli(4-ABA)/EG +1,05 V, (—) poli(4-ABA)/EG +1,15 V e (---) EG.  $\nu = 100$  mV/s. Onde (A) Tempo: 4800 s e (B) Tempo: 2400 s. ....44

**Figura 22:** Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) dos espectros de impedância eletroquímica do EG e poli(4-ABA)/EG, obtidos em solução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Sendo: (—) +0,95 V, (—) +1,05 V, (—) +1,15 V e (—) VC.  $E_{pa} = 0,24$  V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência:  $10^6$  a  $10^{-2}$  Hz. As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais a um circuito equivalente. ....47

**Figura 23:** Circuito equivalente proposto para a simulação dos dados experimentais das medidas de EIE. ....48

**Figura 24:** Imagens de MEV para Poli(4-ABA)/EG obtidos em: (A) +0,95 V; (B) +1,05 V; (C) +1,15 V e (D) VC. Ampliação de 100x. ....51

**Figura 25:** Imagens de MEV para Poli(4-ABA)/EG obtidos em: (A) +0,95 V; (B) +1,05 V; (C) +1,15 V e (D) VC. Ampliação de 200x. ....51

**Figura 26:** Imagens de MEV para Poli(4-ABA)/EG obtidos em: (A) +0,95 V; (B) +1,05 V;

(C) +1,15 V e (D) VC. Ampliação de 500x. .... 52

**Figura 27:** Imagens de MEV para Poli(4-ABA)/EG obtidos em: (A) +0,95 V; (B) +1,05 V; (C) +1,15 V e (D) VC. Ampliação de 1000x. .... 52

**Figura 28:** Imagens de MEV para Poli(4-ABA)/EG obtidos em: (A) +0,95 V; (B) +1,05 V; (C) +1,15 V e (D) VC. Ampliação de 2000x. .... 53

**Figura 29:** VPDs obtidos para a oxidação direta das bases adenina e guanina imobilizadas sobre os Poli(4-ABA)/EG, obtidos em: (—) +0,95 V, (—) +1,05 V, (—) +1,15 V e (—) VC. Tempo de deposição por CA: 4800 s. Número de ciclos: 100 ciclos. Eletrólito: tampão acetato 0,10 M em pH 4,50. .... 55

**Figura 30:** VPDs obtidos para a oxidação direta das bases adenina e guanina imobilizadas sobre os Poli(4-ABA)/EG, obtidos em: (—) +0,95 V, (—) +1,05 V, (—) +1,15 V. Tempo de deposição por CA: 2400 s. Eletrólito: tampão acetato 0,10 M em pH 4,50. .... 56

**Figura 31:** VPDs obtidos para: (---) EG e (—) poli(4-ABA)/EG contendo 20  $\mu\text{L}$  de AM  $5,0 \times 10^{-4}$  M. Eletrólito: Tampão fosfato 0,10 M, pH 7,40. Amplitude: 25 mV; Período do Pulso: 0,20 s; Altura do Pulso: 0,06 s;  $v = 20$  mV/s. Tempo de adsorção<sub>AM</sub> = 5 minutos. .... 59

**Figura 32:** VPDs obtidos para: (—) ssDNA e (—) dsDNA contendo 20  $\mu\text{L}$  de AM  $5,0 \times 10^{-4}$  M. Eletrólito: Tampão fosfato 0,10 M, pH 7,40. Amplitude: 25 mV; Período do Pulso: 0,20 s; Altura do Pulso: 0,06 s;  $v = 20$  mV/s. Tempo de adsorção<sub>AM</sub> = 5 minutos. Eletrodos modificados com poli(4-ABA) por VC (100 ciclos de varredura). .... 60

**Figura 33:** VPDs obtidos para: (---) EG e (—) Poli(4-ABA)/EG contendo 20  $\mu\text{L}$  de BE  $5,0 \times 10^{-4}$  M. Eletrólito: Tampão fosfato 0,10 M, pH 7,40. Amplitude: 25 mV; Período do Pulso: 0,20 s; Altura do Pulso: 0,06 s;  $v = 20$  mV/s. Tempo de adsorção<sub>BE</sub> = 5 minutos. .... 62

**Figura 34:** VPDs obtidos para: (—) ssDNA e (—) dsDNA contendo 20  $\mu\text{L}$  de BE  $5,0 \times 10^{-4}$  M. Eletrólito: Tampão fosfato 0,10 M, pH 7,40. Amplitude: 25 mV; Período do Pulso: 0,20 s; Altura do Pulso: 0,06 s;  $v = 20$  mV/s. Tempo de adsorção<sub>BE</sub> = 5 minutos. Eletrodos modificados com poli(4-ABA) por VC. .... 63

**Figura 35:** Diagramas de Nyquist (o) e Bode (+) dos espectros de impedância eletroquímica do poli(4-ABA)/EG, sendo (A) e (A1) obtidos em solução de KCl 1,0 M e (B), (B1) obtidos em solução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5,00 mM contendo KCl 1,0 M.  $E_{\text{pa}} = 0,26$  V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência:  $10^6$  a  $10^{-2}$  Hz. .... 66

**Figura 36:** Representação esquemática do processo de imobilização para os eletrodos modificados com poli(4-ABA). Sendo (1) poli(4-ABA)/EG, (2) poli(4-ABA)/EG + Sonda, (3)

poli(4-ABA)/EG + Sonda + Alvo Específico e (4) poli(4-ABA)/EG + Sonda + Alvo Não Específico. .... 68

**Figura 37:** Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) dos espectros de impedância eletroquímica do Poli(4-ABA)/EG, obtidos em solução de  $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$  5,00 mM contendo KCl 1,0 M. Sendo: (o) sonda, (o) sonda + alvo específico e (o) sonda + alvo não específico.  $E_{pa} = +0,26$  V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência:  $10^6$  a  $10^{-2}$  Hz. .... 69

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros obtidos a partir dos resultados de simulação de EIE para os EG e poli(4-ABA)/EG eletropolimerizados em função da técnica eletroquímica. ....	49
<b>Tabela 2:</b> Valores de $I_{pa}$ obtidos para detecção de guanina e adenina imobilizadas sobre Poli(4-ABA)/EG, obtidos por VC e CA (4800 s). ....	55
<b>Tabela 3:</b> Valores de $I_{pa}$ obtidos para detecção de guanina e adenina imobilizadas sobre poli(4-ABA)/EG, obtidos por VC e CA (2400 s). ....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**4-ABA** – ácido 4-aminobenzóico

**A** – adenina

**AM** – azul de metileno

**BE** – brometo de etídio

**C** – capacitância

**CA** – cronoamperometria

**CD** – dicroísmo circular, do inglês *circular dichroism*

**C<sub>dl</sub>** – capacitância da dupla camada

**CLAE** – cromatografia líquida de alta eficiência

**DD K** – dermadistinctina K

**DNA** – ácido desoxirribonucléico

**DPC** – dodecilsfosfocolina, do inglês *dodecylphosphocholine*

**dsDNA** – dupla fita de DNA (híbrido)

**EA** – eletrodo auxiliar

**EDX** – energia dispersiva de raios-X

**EFC** – elemento de fase constante

**EG** – eletrodo de grafite

**Poli(4-ABA)/EG** – eletrodo de grafite modificado com filme polimérico de poli(4-ABA)

**EIE** - espectroscopia de impedância eletroquímica

**E<sub>p</sub>** – potencial de pico

**ER** – eletrodo de referência

**ET** – eletrodo de trabalho

**F<sub>moc</sub>** – 9-fluorenilmetoxycarbonila

**G** – guanina

**I<sub>p</sub>** – corrente de pico

**ITC** – calorimetria de titulação isotérmica, do inglês *isothermal titration calorimetry*

**LUVs** – vesículas grandes unilamelares, do inglês *large unilamellar vesicles*

**MEV** – microscopia eletrônica de varredura

**min** – minutos

**mL** – mililitros

**MLVs** – vesículas multi-lamelares, do inglês *multi lamellar vesicles*



**mV/s** – milivolts por segundo

**OCP** – potencial de circuito aberto, do inglês *open circuit potential*

**PABA** – ácido *para*-aminobenzóico

**pb** – pares de base

**PC** – polímeros condutores

**PCR** – reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*

**Poli(4-ABA)** – polímero derivado do ácido 4-aminobenzóico

**poliCT** – citosina e timina monofosfato

**poliGA** – guanosina e adenosina monofosfato

**poliGA:CT** – hibridação poliGA com poliCT

**POPC** – 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina

**POPG** – 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol

**R** – resistência

**RMN** – ressonância magnética nuclear

**RNA** – ácido ribonucléico

**s** – segundos

**SPFS** – síntese de peptídeos em fase sólida

**ssDNA** – simples fita de DNA

**Tris** – tris-hidroxiaminometilmetano

**IUPAC** – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

**V** - volts

**VC** – voltametria cíclica/voltamograma cíclico

**VPD** – voltametria de pulso diferencial/voltamograma de pulso diferencial

**Z'** – componente real de impedância (resistiva)

**Z''** – componente imaginária de impedância (capacitiva)

**W** – impedância de Warburg

**μ** - micro

**v** – velocidade de varredura

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>2</b>
2.1. Objetivo geral.....	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
3.1. Biossensores .....	4
3.1.1. Transdutores.....	5
3.1.2. Receptores.....	7
3.1.3. Técnicas de imobilização .....	7
3.2. Polímeros condutores aplicados em biossensores.....	10
3.3. Ácido 4-aminobenzóico .....	12
3.4. Genossensores .....	14
3.5. Biossensores microbiológicos .....	15
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>19</b>
4.1. Instrumentação e equipamentos .....	19
4.2. Preparo das soluções .....	21
4.3. Procedimento experimental.....	25
4.3.1. Preparação e construção dos eletrodos de trabalho .....	25
4.3.2. Eletropolimerização do 4-ABA .....	26
4.3.3. Propriedades de troca iônica do poli(4-ABA) .....	27
4.3.4. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica .....	27
4.3.5. Medidas de microscopia eletrônica de varredura .....	27
4.3.6. Imobilização e detecção das bases púricas guanina e adenina .....	28
4.3.7. Procedimento de construção do genossensor.....	28
4.3.8. Procedimento de construção do biossensor microbiológico .....	29
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>31</b>
5.1. Condicionamento dos eletrodos de grafite .....	31
5.2. Eletropolimerização do 4-ABA por voltametria cíclica.....	33
5.2.1. Comportamento eletroquímico dos filmes de poli(4-ABA) .....	36

5.2.2. Propriedades de transferência de carga dos filmes de poli(4-ABA).....	38
5.3. Investigação da eletropolimerização do 4-ABA por cronoamperometria.....	40
5.3.1. Eletropolimerização do 4-ABA por cronoamperometria a 4800 segundos .....	40
5.3.2. Eletropolimerização do 4-ABA por cronoamperometria a 2400 segundos .....	41
5.3.3. Avaliação das propriedades eletroquímicas dos filmes de poli(4-ABA) .....	42
5.4. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica.....	46
5.5. Análises da microscopia eletrônica de varredura .....	50
5.6. Imobilização e detecção de guanina e adenina.....	54
5.7. Aplicação das plataformas de poli(4-ABA) em genossensores .....	57
5.7.1. Imobilização e detecção de oligonucleotídeos sobre EG/4-ABA, utilizando-se azul de metileno como indicador.....	58
5.7.2. Detecção de oligonucleotídeos utilizando-se brometo de etídio.....	61
5.8. Aplicação das plataformas de poli(4-ABA) em biossensores microbiológicos .....	64
5.8.1 Resposta da espectroscopia de impedância eletroquímica em polímeros condutores .....	64
5.8.2 Avaliação do poli(4-ABA) na imobilização e detecção impedimétrica do peptídeo dermadistinctina K (DD K).....	67
<b>6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>73</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>84</b>
Técnicas eletroanalíticas .....	84
Voltametria cíclica .....	85
Voltametria de pulso diferencial .....	87
Cronoamperometria .....	87
Espectroscopia de impedância eletroquímica .....	89
Microscopia eletrônica de varredura .....	90

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por melhorias na qualidade de vida, seja na área clínica ou de meio ambiente, tem motivado pesquisadores em toda parte do mundo. O interesse no desenvolvimento e na exploração de dispositivos analíticos para a quantificação e detecção de espécies químicas conduziu ao surgimento dos biossensores, os quais podem monitorar analitos ligados à saúde, alimentos e meio ambiente, contribuindo desta forma, para melhorar a qualidade de vida da sociedade. Assim, os biossensores têm sido muito utilizados para aplicações clínicas, dentre outras, devido às diversas vantagens que estes dispositivos apresentam, como simplicidade de manuseio, fácil confecção, rápida resposta, além de possuir elevada sensibilidade e especificidade, serem portáteis e com potencial de aplicação para os mais diversos fins. Além disso, podem possibilitar o diagnóstico de um paciente no próprio local de atendimento, pois apresentam grande potencial para a miniaturização do sistema sem a necessidade de utilização de equipamentos de grande porte.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de biossensores tem crescido rapidamente, devido às várias potencialidades apresentadas por estes dispositivos. Esta crescente aplicabilidade está diretamente associada ao avanço das pesquisas relacionadas ao estudo e obtenção de polímeros condutores. Assim, eletrodos quimicamente modificados com polímeros condutores apresentam-se como uma alternativa para o monitoramento de várias substâncias em tempo real. Sendo que, este desenvolvimento tecnológico constitui um campo bastante explorado atualmente.

Polímeros condutores funcionalizados permitem a modificação da superfície de eletrodos para diversas aplicações, dentre elas, a incorporação de biomoléculas. Eles têm atraído muito interesse como matriz apropriada para biomoléculas, fornecem boa detecção e rápida resposta do sistema em estudo, tornando-o mais seletivo e sensível o transdutor, além de aumentar a eficiência da fixação e estabilização das biomoléculas. Além disso, aumentam a velocidade, sensibilidade e versatilidade dos biossensores em várias aplicações, como o diagnóstico de doenças e monitoramento ambiental. Devido a isto, filmes polímeros derivados de monômeros funcionalizados, têm sido bastante explorados e utilizados na confecção de diversos tipos de biossensores.

Os polímeros condutores são muito diversificados, porque podem ser formados por alguns tipos de monômeros em superfícies de diferentes eletrodos, sendo então utilizados para a determinação de diversos analitos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Eletropolimerizar filmes poliméricos derivados do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), sobre eletrodos de grafite e caracterizar o material formando por meio de técnicas eletroquímicas, para utilização deste material como transdutor na construção de dispositivos para detecção de bases nitrogenadas, oligonucleotídeos e peptídeos, os quais visam contribuir para o desenvolvimento dos biossensores que possam ser utilizados na detecção em tempo real, destes analitos.

### 2.2. Objetivos específicos

- Eletropolimerizar o ácido 4-aminobenzóico sobre eletrodos de grafite utilizando-se as técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria;
- Comparar e caracterizar os filmes poliméricos formados através das técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria;
- Analisar e investigar as propriedades eletroquímicas do poli(4-ABA) utilizando-se a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica;
- Otimizar os parâmetros de eletropolimerização;
- Avaliar a estabilidade eletroquímica do poli(4-ABA);
- Avaliar as propriedades de superfície das plataformas desenvolvidas;
- Caracterizar a morfologia dos eletrodos de grafite modificados pela técnica de microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar as plataformas de poli(4-ABA) na imobilização de biomoléculas;
- Avaliar a utilização das plataformas funcionalizadas para imobilização das bases nitrogenadas adenina e guanina,
- Avaliar a utilização das plataformas funcionalizadas para imobilização de oligonucleotídeos;
- Avaliar a resposta do genossensor com detecção direta e indireta, nesta última, utilizando-se intercaladores eletroativos como o azul de metileno e o brometo de etídio, para detecção e reconhecimento dos eventos de hibridização dos oligonucleotídeos;

- Avaliar por espectroscopia de impedância eletroquímica a utilização da plataforma na imobilização de peptídeos e seu reconhecimento com alvos específicos e não específicos;
- Desenvolver um sistema de detecção eletroquímica de baixo custo, alta reprodutibilidade e sensibilidade, rápida resposta de análise, portabilidade e com boa afinidade do componente biológico com a plataforma de poli(4-ABA).

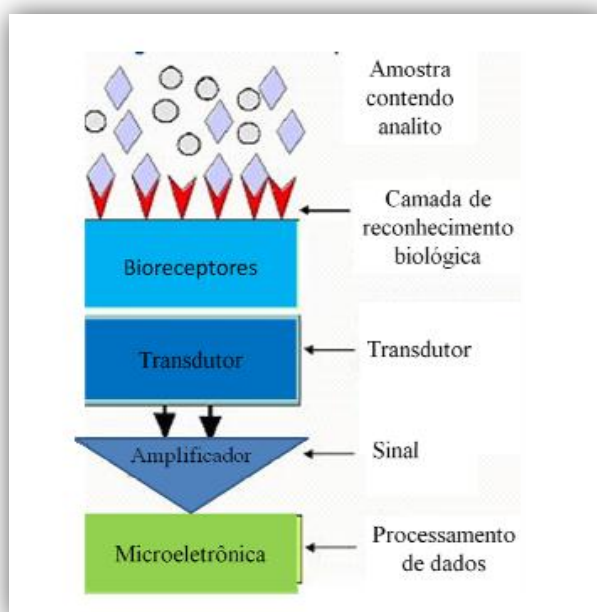
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Biossensores

O desenvolvimento de sensores com características importantes como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade é uma área de grande crescimento e interesse dentro da química analítica. Tal interesse deve-se à possibilidade de aplicação destes em análises dos mais diversos tipos de amostras tais como ambiental, clínica e industrial<sup>1</sup>.

Na área de bioanalítica, um dos desafios é a detecção rápida e simultânea de vários compostos de diferentes fontes, a partir de amostras clínicas, alimentícias e ambientais<sup>2</sup>. Este fato impulsiona cada vez mais, a busca por estudos mais elaborados visando facilitar diagnósticos clínicos<sup>3</sup>. Uma forma de se alcançar um sensor com estas características é a modificação de eletrodos sólidos, que permite o desenvolvimento dos mais variados tipos de sensores<sup>1</sup>.

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC)<sup>4</sup>, um biossensor é um dispositivo que é capaz de fornecer uma informação analítica específica ou quantitativa pelo uso de um elemento de reconhecimento biológico (camada de reconhecimento) em contato direto com o elemento de transdução<sup>5</sup>. Na Figura 1, é apresentado o esquema ilustrativo de um biossensor.



**Figura 1:** Esquema representativo de um biossensor.

Assim, um biossensor combina a especificidade de um componente biológico ativo para o analito de interesse e a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal biológico em um sinal quantificável; por exemplo, um sinal elétrico, que é proporcional à concentração do analito em questão e mensurável através de um sistema de detecção específico<sup>6</sup>.

O uso do material biológico adequado (receptor bioquímico) na construção de biossensores para um determinado analito de interesse, resulta em sensores altamente seletivos e sensíveis e pode apresentar diversas vantagens em relação aos eletrodos convencionais, tais como: aumento da sensibilidade, seletividade e estabilidade, diminuição do limite de detecção do procedimento, baixo custo e facilidade na construção, resposta rápida, potencial para miniaturização e construção de equipamentos simples e portáteis<sup>7</sup>.

Desde 1962, quando o primeiro biossensor foi construído para a detecção de glicose<sup>8</sup>, vários pesquisadores de todo o mundo tem trabalhado nessa nova área da ciência. O próprio biossensor de glicose até hoje é motivo de estudos<sup>9,10</sup>, com mais de 40 tipos de dispositivos no mercado. Este fato mostra a evolução dos sistemas e da constante busca por melhoria nas detecções, não só nas áreas médicas, como o controle de diabetes por monitoramento de glicose e outras doenças, mas também no monitoramento e controle de fármacos, alimentos e do meio ambiente. Dentre os diversos tipos de biossensores, o transdutor, o receptor (camada de reconhecimento) e o modo de interação entre ambos são a chave para a construção destes dispositivos<sup>11</sup>. Portanto, o transdutor e o receptor são as principais etapas do processo de detecção em biossensores<sup>12</sup>.

### **3.1.1. Transdutores**

A eletroquímica é uma área de grande interesse e tem sido muito utilizada como sistema para a construção de biossensores, devido à diversidade de técnicas e materiais que podem ser utilizados como transdutores, aliadas a facilidade de construção e de mensuração. Eletrodos de diversos materiais tais como: platina, ouro, carbono grafite, carbono vítreo e pasta de carbono, dentre outros são os mais utilizados na construção e desenvolvimento destes dispositivos. Além disso, os sistemas eletroquímicos podem ser miniaturizados, através da utilização de eletrodos impressos (*screen-printed*), para tornarem-se utilizados comercialmente, uma vez que estes sistemas apresentam baixo custo, fácil manuseio, além da mínima quantidade de amostra utilizável, porém, mantendo a alta sensibilidade necessária<sup>11</sup>.

O transdutor pode variar em sua forma e função, para adequar-se a medida de interesse. O transdutor é o elemento que recebe as perturbações do processo biocatalítico -



geradas pela interação receptor-analito e converte-as em um sinal mensurável (físico ou químico) que pode ser eletronicamente visualizado, amplificado e armazenado<sup>13</sup>. O tipo de transdução de sinal está diretamente relacionado à característica física ou química do produto gerado pelo componente biológico<sup>14,15</sup>.

O sistema de transdução deve ser adequado ao sensor de acordo com a natureza da interação bioquímica com as espécies de interesse<sup>16</sup>. Assim, de acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, os tipos de transdutores são classificados basicamente desta forma: *eletroquímicos*, dentre eles os amperométricos (que convertem o sinal biológico em corrente elétrica), os potenciométricos (convertem o sinal biológico em um potencial elétrico) e os condutimétricos (que alteram a condutividade elétrica do substrato); *impedimétricos* (quando se detecta a variação da impedância no eletrodo); *calorimétricos* (alteram a entalpia de reação do substrato); *acústicos ou piezelétricos* (relaciona a oscilação da frequência de cristais piezelétricos com variações na massa); *ópticos* (provocam um desvio no caminho óptico ou variação de absorbância relacionada com a presença do analito) e os *termométricos* (a detecção do analito gera uma variação de temperatura)<sup>3,17</sup>.

Os transdutores eletroquímicos se destacam na construção de biossensores<sup>18,19</sup>, pois os transdutores amperométricos e potenciométricos apresentam maior sensibilidade, facilidade de construção e estabilidade, além disso, são relativamente simples e estão em um estágio mais avançado de pesquisa em relação aos outros transdutores citados. Estes fatores somados justificam a busca por biossensores versáteis, de baixo custo e com uma seletividade específica a partir da utilização de polímeros condutores como camada ativa<sup>3</sup>.

As detecções podem ser realizadas com base nas propriedades eletroquímicas das biomoléculas. A presença de grupamentos oxidáveis nas estruturas biológicas pode ser detectada por medidas de corrente e carga. Estas podem ser oxidadas ou reduzidas utilizando voltametrias de pulso, na qual uma faixa de potencial é aplicada e a corrente é medida proporcionalmente à concentração do analito em questão<sup>20</sup>. Então, conhecendo-se o sistema, pode-se realizar uma amperometria, na qual há a aplicação de um potencial fixo e a medida de corrente é realizada diretamente em função do tempo, esse tipo de biossensor é um dos mais encontrados e utilizados como transdutores eletroquímicos<sup>21</sup>. A presença de pares redox, ou seja, substâncias que apresentam simultaneamente potenciais de oxidação e redução podem ser trabalhadas por voltametria cíclica, na qual, assim como nas voltametrias de pulso, uma faixa de potencial é aplicada, porém, como um ciclo, tanto anódico quanto catódico. Isso permite a avaliação das regiões redox das biomoléculas. Assim, após este estudo, reconhecendo o potencial redox da biomolécula, pode-se realizar uma voltametria de onda

quadrada. Nesta, o sinal de redução é invertido e somado ao de oxidação, ampliando o sinal e possibilitando uma detecção mais sensível. Biossensores voltamétricos também são comuns na literatura<sup>22</sup>. Dentre os métodos voltamétricos em eletroquímica, destacam-se a voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. A primeira, dentre outras funções, é utilizada para a modificação dos eletrodos de trabalho com polímeros e sua caracterização, enquanto que a segunda é utilizada na construção de sensores. As técnicas citadas aqui estão descritas detalhadamente no Apêndice A.

### **3.1.2. Receptores**

O receptor é uma biomolécula ou um biocomponente, um elemento biologicamente ativo que interage de forma específica com o analito. Desta forma, é considerado biocomponente todo o elemento vivo ou derivado de um agente vivo capaz de ser imobilizado em contato íntimo com a superfície de um sensor, de forma a reconhecer determinada espécie de interesse quantitativo, ou seja, o elemento de reconhecimento biológico deve ser sensível a um analito de interesse. Essas biomoléculas, as quais atuam como agentes de reconhecimento podem ser tecidos, células, anticorpos, antígenos, enzimas, fragmentos de DNA, bicamadas lipídicas, monocamadas fosfolipídicas e outras<sup>21</sup>.

Os biossensores podem ser divididos basicamente em duas classes: os catalíticos, que utilizam enzimas imobilizadas e os de afinidade, que utilizam anticorpos, DNA ou peptídeos, como moléculas de bioreconhecimento<sup>15</sup>.

A imobilização das biomoléculas é a etapa mais importante na construção de um biossensor, uma vez que a atividade do componente imobilizado deve ser mantida ao máximo. Entende-se por imobilização o método pelo qual o componente biológico liga-se ao sensor, mantendo suas propriedades biológicas naturais<sup>23</sup>. Para a realização deste procedimento existem algumas técnicas de imobilização, que estão descritas a seguir.

### **3.1.3. Técnicas de imobilização**

A etapa mais importante para o desenvolvimento de um biossensor é a imobilização da camada de reconhecimento ao transdutor. Em um biossensor a biomolécula incorporada atribui um alto grau de seletividade, porém é vulnerável a condições extremas do meio, tais como temperatura, pH e força iônica<sup>24</sup>.

Desta forma, vários métodos de imobilização de biomoléculas têm sido usados para o

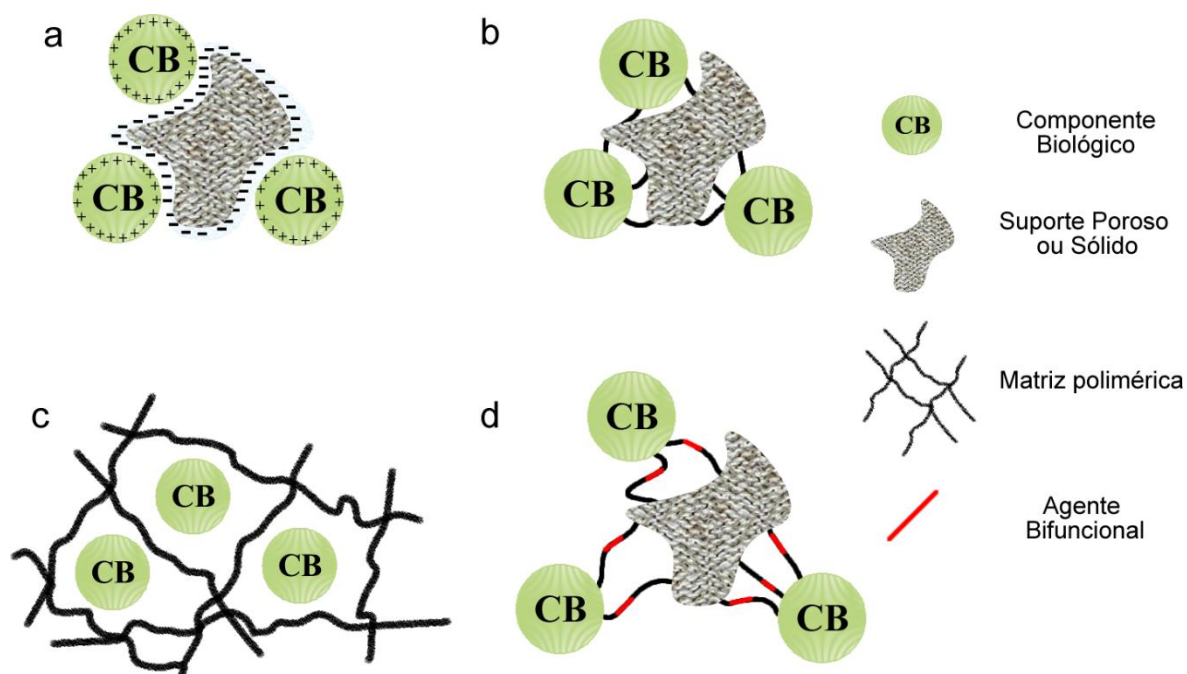
desenvolvimento de um biossensor, assim, existe uma grande variedade de procedimentos nos quais as imobilizações podem ocorrer. A imobilização dos componentes de reconhecimento sobre a superfície modificada representa o fator determinante para o bom funcionamento do biossensor<sup>25</sup>.

As técnicas mais utilizadas para imobilização e desenvolvimento de biossensores específicos são classificadas em físicas e químicas, dentre as físicas têm-se como exemplos a adsorção física e a oclusão (*entrapment*). Dentre as químicas têm-se as ligações covalentes e as ligações cruzadas (*cross-linking*)<sup>12</sup>. Estas técnicas estão descritas a seguir.

- **Adsorção física:** esta técnica retém a biomolécula que se deseja imobilizar nas proximidades da superfície do transdutor, através de interações físicas entre a biomolécula e a matriz, que pode ser polimérica<sup>26</sup>. Essas interações podem ser do tipo Van der Waals ou eletrostática, dipolo-dipolo ou por ligações de hidrogênio<sup>27</sup> quando a biomolécula interage com a matriz por meio de seus domínios hidrofóbicos, ou ainda, pode permanecer armadilhada aos poros da matriz polimérica. As vantagens da imobilização por adsorção é que, não há a necessidade da presença de reagentes para a imobilização, além disto, a matriz pode ser regenerada, já que não ocorre nenhuma modificação do componente biológico, que propicia a máxima retenção da atividade biomolecular<sup>3</sup>. É uma técnica simples, rápida e de baixo custo, entretanto, apresenta baixa estabilidade, as forças de ligação são susceptíveis à mudança de pH, temperatura e força iônica do meio<sup>28,29</sup>.
- **Oclusão:** esta técnica é utilizada quando o componente biológico é preparado em conjunto com o produto de modificação da superfície do eletrodo, deixando assim as biomoléculas aprisionadas. Um exemplo disso é a preparação de filmes poliméricos em soluções contendo biomoléculas, onde estas ficam presas dentro da matriz do polímero, durante a polimerização. Na adição, o “*aprisionamento*” ocorre sem reação química que possa afetar a atividade do material. A vantagem da polimerização eletroquímica é que o filme pode ser preparado facilmente em um rápido procedimento, além da possibilidade de eletrogerar um polímero cobrindo parte da superfície de um eletrodo de geometria complexa, apresentando um baixo custo, além de ser um procedimento simples. Como desvantagem, esta técnica apresenta uma alta barreira de difusão e a perda da atividade biomolecular pela formação de radicais livres<sup>3,29</sup>.

- **Ligação covalente:** é efetuada através da ligação entre grupos funcionais da molécula biológica de interesse, e uma matriz de suporte. Como matriz de suporte é comum usar filmes poliméricos, os quais podem ser eletropolimerizados sob condições (solvente orgânico, altos valores de potenciais para o processo de polimerização) que normalmente causariam danos às biomoléculas. Além disso, a ligação covalente entre a biomolécula e o polímero funcionalizado pode ser feita em solução tampão aquosa contendo aditivos e estabilizadores, os quais preservam a atividade catalítica e, ou as propriedades de reconhecimento das biomoléculas. Esta técnica apresenta como vantagem a baixa resistência difusional, ao passo que a desvantagem vem do fato de que a matriz de suporte não é regenerável, o que pode provocar a perda da atividade<sup>3,29</sup>.
  
- **Ligação cruzada:** baseia-se na imobilização como resultado da reação do componente biológico com um agente bifuncional em que se formam as ligações covalentes intermoleculares. A escolha do agente de “cross-linking” é feita, de acordo com os grupos funcionais presentes na biomolécula sendo, no entanto, a escolha final realizada de maneira empírica. Portanto, esta técnica requer o uso de agentes bifuncionais, tal como o glutaraldeído, que contêm grupos reativos terminais específicos que irão reagir com grupos funcionais como as aminas de algumas biomoléculas a imobilizar, ou agentes multifuncionais, como hexametileno diisocianato, para imobilização da biomolécula em vários tipos de suportes sólidos<sup>30</sup>. Ao usar esta técnica é necessário que haja preocupação com a acessibilidade ao componente bioativo. A vantagem de seu uso é que a perda da atividade do componente biológico é mínima, e o custo envolvido é relativamente moderado. A desvantagem deste procedimento é a formação de barreiras de difusão, que pode provocar tempos de resposta maiores para o biossensor<sup>3,31</sup>.

A resposta das biomoléculas imobilizadas depende de alguns fatores como: área superficial, porosidade, caráter hidrofílico da matriz imobilizada, condições de reação e metodologia escolhida para a imobilização. As principais técnicas de imobilização estão representadas esquematicamente na Figura 2.



**Figura 2:** Esquema representativo das quatro principais técnicas de imobilização de biomoléculas. (a) adsorção física, (b) ligação covalente, (c) oclusão, (d) ligação cruzada.

As técnicas de imobilização têm sido estudadas de diferentes maneiras na área de desenvolvimento dos biossensores. Quanto maior a facilidade do procedimento de imobilização, maior a chance de sucesso no funcionamento destes dispositivos. Uma alternativa para a melhoria de uma técnica de imobilização é a modificação da superfície do transdutor com polímeros condutores que apresentem em suas estruturas grupos funcionais que possam interagir com grupos específicos das biomoléculas. Nos últimos anos, os polímeros condutores têm atraído muito interesse como uma matriz apropriada das biomoléculas, pois a utilização de superfícies funcionalizadas permite aumentar a velocidade, sensibilidade e a versatilidade dos biossensores.

### 3.2. Polímeros condutores aplicados em biossensores

Polímeros são compostos com elevada massa molar, formados pela repetição de um grande número de unidades químicas, justificando a origem de sua nomenclatura (do grego *poli* “muitos”; *meros* “partes”). A elevada massa molar caracteriza os polímeros como macromoléculas. Existem polímeros orgânicos e inorgânicos, sendo os primeiros os mais estudados e mais importantes comercialmente. As substâncias que dão origem aos polímeros por reação química (reação de polimerização) são chamadas de monômeros (do grego *mono*

“uma”; *meros* “parte”). Os polímeros podem ser formados por apenas uma espécie de monômero (homopolímeros) ou por espécies diferentes (copolímeros), e podem ser de origem natural ou sintética<sup>32</sup>.

Desde a década de 60, é conhecido que moléculas orgânicas que apresentam duplas ligações conjugadas podem exibir propriedades semicondutoras. Inicialmente, os polímeros foram utilizados como isolantes elétricos até que, em 1977, Shirakawa e colaboradores<sup>33</sup> demonstraram a existência de propriedades semicondutoras e metálicas para o poliacetileno dopado (intrinsecamente um isolante)<sup>1</sup>. A partir de então uma nova classe de polímeros surgiu, sendo chamados de polímeros condutores.

Os polímeros condutores apresentam um potencial tecnológico muito amplo, pois além da condutividade elétrica, existem várias outras propriedades, as quais viabilizam um vasto campo de aplicações para estes materiais<sup>34</sup>. Portanto, a utilização de materiais poliméricos eletroativos para recobrir a superfície de eletrodos foi um passo importante no desenvolvimento de eletrodos modificados, devido às potenciais vantagens associadas a estes materiais<sup>35</sup>.

A pesquisa na área de polímeros condutores para aplicações biomédicas teve uma grande expansão com a descoberta nos anos 80, de que estes materiais são compatíveis com muitas moléculas biológicas<sup>36</sup>. Além disso, os polímeros condutores apresentam vantagens como baixo custo, são fáceis de sintetizar e possuem propriedades bastante versáteis. Quanto à síntese, ainda há uma vantagem adicional visto que podem ser precisamente sintetizados e depositados na forma de filmes finos sobre a superfície de um eletrodo, podendo estar diretamente em contato com biomoléculas<sup>37</sup>.

Levando em consideração todas as vantagens descritas acima, um dos grandes avanços proporcionados pela descoberta dos polímeros condutores foi o aprimoramento dos biossensores. Os polímeros condutores, por serem biocompatíveis, auxiliam tanto na imobilização do elemento sensível na superfície do biossensor quanto na conversão do sinal biológico em sinal elétrico, a partir das suas propriedades condutoras<sup>37</sup>. São utilizados também, para aumentar a estabilidade, velocidade e sensibilidade em diversas aplicações<sup>38,39</sup>.

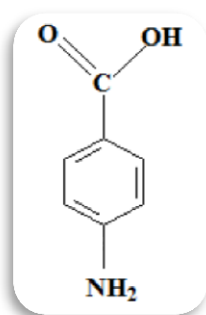
Como apresentado na literatura, há diversas formas de imobilização de biomoléculas e todas elas podem usar como suporte um polímero condutor, proporcionando boa faixa de detecção e rápida resposta, já que a reação redox ocorre no interior da matriz do polímero<sup>38</sup>. Ao mesmo tempo em que o polímero condutor atua como suporte para a imobilização de biomoléculas, ele está atuando também como transdutor, auxiliando no transporte de cargas elétricas<sup>39</sup>. Desta forma, a utilização de polímeros condutores possibilita a criação de

biossensores simples, de rápida resposta, estáveis, fáceis de produzir, podem ser miniaturizados e possuem grande potencial de aplicação já que os mais diversos biocomponentes (células, proteínas, enzimas, anticorpos e etc.) podem ser imobilizados junto ao polímero para a detecção de analitos que variam desde a glicose até fragmentos de DNA<sup>17</sup>.

Os monômeros utilizados para a eletrossíntese de polímeros condutores são geralmente compostos aromáticos. Isto é devido à facilidade com que esses compostos podem ser oxidados a cátions-radicaís relativamente estáveis durante a eletropolimerização<sup>40</sup>. Desta forma, filmes poliméricos derivados de monômeros aromáticos funcionalizados, eletrodepositados em eletrodos condutores têm sido uma das principais atividades de pesquisa na área da eletroanalítica nos últimos anos.

### 3.3. Ácido 4-aminobenzóico

O monômero ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), também conhecido como ácido *para*-aminobenzóico ou PABA, é um composto com fórmula molecular  $C_7H_7NO_2$ . É caracterizado por tratar-se de um pó cristalino de cor branca, inodoro e ligeiramente solúvel em água. O 4-ABA é um material eletroquimicamente ativo, a sua molécula consiste de um anel benzeno ligado a dois grupos funcionais, uma amina ( $-NH_2$ ) e uma carboxila ( $-COOH$ ), com valores de  $pK_a$  de 2,50 e 4,87. Sua estrutura química está representada na Figura 3.



**Figura 3:** Estrutura química do 4-ABA.

A utilização do 4-ABA para o desenvolvimento deste estudo deve-se ao fato do monômero possuir grupos funcionais que podem interagir com as biomoléculas, formando ligações com estas, garantindo assim maior estabilidade para o componente biológico imobilizado, e consequentemente maior sensibilidade para o sistema em estudo. Geralmente os grupos funcionais presentes no monômero são preservados após a eletropolimerização,

portanto, eletrodos modificados com estes filmes encontram-se funcionalizados e isso favorece a interação com materiais biológicos, o que justifica o interesse no estudo destes materiais com aplicação na construção e desenvolvimento dos biossensores eletroquímicos.

Monômeros eletroquimicamente polimerizáveis, apresentam potenciais de oxidação relativamente baixos, suscetíveis a reações de substituição eletrofilica<sup>28</sup> e decréscimo no potencial de oxidação no decorrer das reações de acoplamento, o que favorece o crescimento das cadeias<sup>17,41</sup>.

O 4-ABA é um monômero pouco reportado na literatura, apesar disso, é um monômero que é utilizado em diferentes aplicações. Ele contém em sua estrutura o átomo de N, rico em elétrons e alta densidade eletrônica do grupo carboxila, sendo fácil de ser polimerizado em eletrodo de carbono vítreo pela técnica de voltametria cíclica. Jin e colaboradores<sup>42</sup> utilizaram eletrodo modificado com poli(4-ABA) para investigar um modelo experimental de Parkinson em animais pela determinação sensível de dopamina, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Huang e colaboradores<sup>43</sup> utilizando esse mesmo sistema desenvolveram um sensor eletroquímico conveniente e sensível, para a determinação do triptofano em amostras farmacêuticas, enquanto que Liu e colaboradores<sup>44</sup> determinaram melanina em produtos lácteos. O teor de buformina (medicamento que trata a diabetes) foi determinado em produtos farmacêuticos, comercialmente disponíveis na forma de comprimidos, por Jin e colaboradores<sup>45</sup>.

Kotkar e Srivastava<sup>46</sup> estudaram o comportamento voltamétrico do ácido 4-aminobenzóico, sobre eletrodo de pasta de carbono, e em eletrodos modificados com compostos macrocíclicos. Enquanto que Silva e Pezza<sup>47</sup> desenvolveram um método analítico para a determinação do ácido 4-aminobenzóico em formulações farmacêuticas via análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica.

Yuzhong Zhang e colaboradores<sup>48</sup> fabricaram um biossensor eletroquímico de DNA, estável e reprodutível, para a detecção de DNA alvo. O 4-ABA foi eletropolimerizado sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas com grupos carboxila (MWCNTs) por voltametria cíclica. Nanopartículas de ouro (AuNPs) foram subsequentemente introduzidas na superfície do filme composto de PABA-MWNTs através da deposição eletroquímica, a voltametria de pulso diferencial foi utilizada para monitorar o evento de hibridização do DNA através da medida da adriamicina intercalada.

Neste trabalho, avaliou-se a utilização do 4-ABA para o desenvolvimento de plataformas eletroquímicas para aplicação em dois tipos de biossensores: genossensores e



biossensores microbiológicos. Para melhor compreensão do mecanismo de funcionamento destes dispositivos, realizou-se uma abordagem mais específica a qual será descrita abaixo.

### 3.4. Genossensores

Existem vários tipos de biossensores, um exemplo deles são os genossensores, conhecidos como biossensores de DNA. Estes dispositivos altamente seletivos resultam das propriedades específicas de interação das bases nitrogenadas presentes na molécula de DNA. São constituídos de oligonucleotídeos, produtos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou fragmentos de DNA imobilizados na superfície de um transdutor<sup>49</sup>.

Os genossensores baseiam-se na imobilização de fragmentos de DNA ou oligonucleotídeos. Métodos diretos e indiretos são usados para detecção da imobilização de sonda e alvo sobre a matriz. A chamada fita simples (*ssDNA*), após interação com o alvo complementar regenera a dupla fita (*dsDNA*), num processo denominado de hibridização. Este sinal pode ser detectado de forma direta, através da oxidação das bases nitrogenadas presentes no DNA, ou de forma indireta, por meio de intercaladores/indicadores, como o azul de metileno (AM) e o brometo de etídio (BE), dentre outros<sup>50,51</sup>.

É possível detectar significativamente os eventos de hibridização através da detecção indireta do AM e do BE. O AM interage através de interações eletrostáticas, intercalação direta na dupla fita ou pelas ligações preferenciais às bases nitrogenadas guanina livres presentes na fita simples<sup>52,53</sup>. A utilização do AM para detectar hibridização do DNA é baseada na baixa afinidade do AM com a *dsDNA* quando comparada a *ssDNA*. Tem sido demonstrado que o AM se liga especificamente a base purina guanina<sup>53,54</sup>. Desta forma, o sinal de baixa intensidade de corrente que é observado após o evento de hibridização, é devido à baixa interação do AM com a *dsDNA*, devido à formação do híbrido que diminui o acesso de intercalação do AM às bases guanina. Por outro lado, o BE apresenta melhor interação com a dupla fita do DNA (*dsDNA*). Isso se deve ao efeito intercalante do BE sobre o DNA nativo<sup>11</sup>, ou seja, hibridizado, onde ele pode se acomodar mais facilmente entre os pares de bases da estrutura, sendo deste modo promissor na detecção indireta.

Os genossensores podem detectar a presença de genes específicos ou genes mutantes associados a doenças humanas hereditárias<sup>55</sup>. A identificação de genes associados com doenças e com seus estágios são áreas de pesquisa intensa na comunidade científica do mundo, e esta atividade é de extrema necessidade<sup>56</sup>. As diversas mutações responsáveis por desordens herdadas são conhecidas e este conhecimento vem aumentando firmemente em

todo o mundo. Decifrar a estrutura, a organização e a sequência de moléculas de ácidos nucleicos, como também, aplicações importantes em diversos campos como diagnóstico clínico, pesquisas e desenvolvimento de novas drogas, terapia gênica, tecnologia de alimentos, ciências ambientais, forensis, etc<sup>28</sup>. Além disso, os biossensores de hibridização de DNA oferecem a promessa considerável para obter a informação sequência-específica de forma mais rápida e barata, além de um diagnóstico simples de doenças genéticas e infecciosas, comparada aos ensaios tradicionais de hibridização<sup>57</sup>, uma proposta oportuna, interessante e atual<sup>28</sup>.

Diante deste contexto, genossensores têm sido muito utilizados na área de eletroanalítica para investigações e diagnósticos genéticos<sup>49</sup>, pois nos últimos anos, o número de doenças terminais cresceu muito, e há pouco sucesso na detecção nos estágios iniciais destas doenças, sendo então necessário um diagnóstico que possa detectar a doença em fase precoce, para que esta apresente grandes possibilidades de cura. Diante disso, torna-se interessante o surgimento de propostas de detecção, baseadas no desenvolvimento de novas plataformas diagnósticas que tenham como características a especificidade, sensibilidade, baixo custo e rapidez na análise. Como os genossensores apresentam estas características, eles podem atuar na detecção de várias doenças. Portanto, propõe-se a desenvolver plataformas eletroquímicas para genossensores e através de estudos posteriores utilizar-se no futuro estes dispositivos para aplicações clínicas, como a detecção de doenças de forma rápida e precisa pela imobilização de sequências genéticas específicas.

### **3.5. Biossensores microbiológicos**

Peptídeos ou polipeptídeos são macromoléculas constituídas por uma cadeia (polímero) linear e específica de mais de dez aminoácidos. São membros de uma classe de compostos ligados entre si por ligações peptídicas, formando estruturas lineares, ramificadas ou cíclicas. Por exemplo, o glucagon e a insulina, dois hormônios, incluem-se nesta divisão. As proteínas também são chamadas de polipeptídeos, por que os aminoácidos que as compõem são unidos por ligações peptídicas, uma ligação peptídica é a união do grupo amino ( $-NH_2$ ) de um aminoácido com o grupo carboxila ( $-COOH$ ) de outro aminoácido, através da formação de uma amida<sup>58</sup>.

Atualmente é descrita uma grande variedade de organismos vivos capazes de produzir moléculas de peptídeos que atuam na primeira linha de suas defesas. Tais moléculas podem ser sintetizadas constantemente pelo organismo ou somente após uma lesão ou infecção,

tendo-se revelado responsáveis pelo sistema imune inato com amplo espectro de atividade biológica. Embora o estudo seja relativamente recente, milhares destas moléculas já foram isoladas e tiveram suas atividades biológicas comprovadas. Destas, a grande maioria apresenta atividade antimicrobiana, de grande importância no sistema de defesa do organismo<sup>9</sup>.

Assim, a ciência moderna está à procura de novos compostos antimicrobianos para evitar infecções persistentes, porque quimioterapias clássicas têm sido ineficazes nessas infecções. Substâncias naturais de toxinas animais são o novo foco de estudo, como potenciais peptídeos antimicrobianos. Muitos organismos empregam substâncias químicas ativas como, por exemplo, aminas, derivados de esteróides, alcalóides e peptídeos para se defender de predadores e de microrganismos patogênicos. Dentre essas substâncias químicas, destacam-se os peptídeos que podem ser encontrados em uma vasta variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas, insetos, peixes, anfíbios, aracnídeos e mamíferos. A grande maioria destes peptídeos apresenta propriedade antimicrobiana cujo mecanismo de ação não depende da interação com um receptor específico, tornando-os opções alternativas aos antibióticos disponíveis comercialmente. Entretanto, o mecanismo pelo qual peptídeos exercem sua atividade antimicrobiana ainda não é completamente definido, assim muitos estudos são necessários para uma maior compreensão do modo de ação destas moléculas em células bacterianas. Desta forma, vários mecanismos têm sido propostos para descrever a interação entre peptídeos e bicamadas lipídicas<sup>59</sup>.

Diferentemente dos mecanismos de ação de antibióticos clássicos, que se baseiam em inibições enzimáticas, sendo relativamente lentos, peptídeos antimicrobianos interagem na superfície de células bacterianas. Alguns estudos com anfíbios demonstram que a secreção de peptídeos antimicrobianos aumenta com a exposição destes animais a microrganismos e patógenos, atuando como uma barreira inicial a estes organismos<sup>60</sup>.

O peptídeo antimicrobiano dermadistinctina K (DD K) é isolado das glândulas da espécie *Phyllomedusa distincta*, anuro encontrado na Floresta Atlântica<sup>61</sup>, pertencente à classe das dermaseptinas, que consistem em moléculas catiônicas de 28 a 34 resíduos, capazes de permeabilizar membranas bacterianas<sup>62</sup>.

Este peptídeo é constituído de 33 resíduos de aminoácidos, cuja sequência é descrita como: GLWSK IKAAG KEAAK AAKA AGKAA LNAVS EAV, apresentando baixa atividade hemolítica<sup>62</sup> e um amplo espectro de atividades contra alguns microrganismos patogênicos<sup>63</sup>. O DD K apresenta uma hélice anfipática do resíduo Lys-7 até a extremidade C-terminal, é uma molécula de caráter catiônico e relativamente pequena<sup>64</sup>. O caráter catiônico

ocorre devido à presença de excesso de resíduos de lisina (K) que constituem o peptídeo. Muitos modelos mostram que o caráter catiônico é determinante para a atração inicial de peptídeos antimicrobianos à superfície das membranas de bactérias e de outros microrganismos, os quais apresentam uma superfície eletricamente negativa devido aos grupamentos fosfato dos fosfolipídeos<sup>60</sup>.

O DD K é um peptídeo  $\alpha$ -helicoidal que ataca a biomembrana de bactérias, em vez da membrana da célula humana. O conhecimento do mecanismo de ação de peptídeos é importante para conceber uma nova geração de antibióticos. Portanto, o interesse no estudo das atividades antimicrobianas apresentadas por peptídeos isolados da secreção cutânea de anuros surgiu após o isolamento e a purificação do peptídeo *bombinin*, da rã *Bombina variegata*<sup>65</sup>. Desde então, vários peptídeos têm sido sequenciados e sintetizados<sup>59</sup>.

Desta forma, embora uma vasta diversidade de sequências peptídicas tenha sido identificada, as quais se diferem em composição de aminoácidos, tamanho da cadeia e estrutura, muitas destas moléculas apresentam propriedades físico-químicas comuns, como a tendência de adotarem uma estrutura helicoidal anfipática quando interagem com membranas fosfolipídicas. Atualmente vários modelos indicam que o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos ocorre pela combinação de efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos. Estes peptídeos carregados positivamente são atraídos pela superfície aniônica das membranas bacterianas, onde sofrem mudanças conformacionais adotando uma estrutura anfipática<sup>60</sup>.

A anfipaticidade é caracterizada pela separação de uma face hidrofóbica e de uma hidrofílica, normalmente carregada positivamente, e ocorre em estruturas  $\alpha$ -helicoidais de peptídeos antimicrobianos lineares. O caráter anfipático pode ser formado com uma sequência periódica de resíduos polares e apolares em um intervalo entre três a quatro resíduos de aminoácidos. Dessa forma, as cadeias laterais polares e apolares dos resíduos de aminoácidos posicionam-se adequadamente para uma separação em faces opostas.

Mesmo que o mecanismo pelo qual os peptídeos exercem sua atividade antimicrobiana ainda não seja completamente definido, várias propostas têm sido descritas para a interação entre peptídeos e bicamadas lipídicas, que compõem as paredes celulares bacterianas. A bicamada é um tipo de agregado que pode ser formado pela adição de fosfolipídeos em solução aquosa. Neste caso, duas camadas de fosfolipídeos unem-se formando uma bicamada com superfície superior e inferior hidrofílicas e com o interior composto por uma porção hidrofóbica<sup>59</sup>.

Este tipo de agregado forma-se quando a seção transversal da porção hidrofílica é similar à da porção hidrofóbica, como ocorre em moléculas de 1-palmitoil-2-oleoil-

fosfatidilcolina (POPC). Entretanto, a região hidrofóbica permanece ainda em contato com a água e este tipo de agregado tende a se reorganizar rapidamente, formando estruturas denominadas de vesículas ou lipossomas que possuem maiores estabilidades termodinâmicas. Nesta estruturação, as cadeias hidrofóbicas dos fosfolipídeos encontram-se completamente isoladas das moléculas de água, assim, a anfipaticidade de DD K favorece a interação com a bicamada e, conseqüentemente, a dessolvatação da face hidrofóbica, ou seja, resultando em uma maior dessolvatação do sistema, permitindo sua inserção na bicamada<sup>59</sup>.

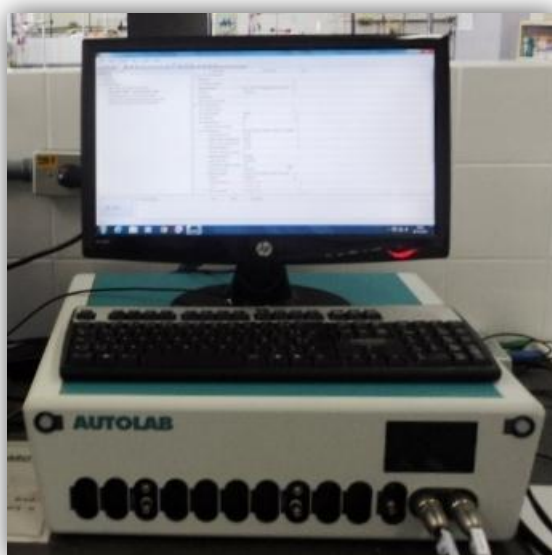
Na literatura está reportado que as preferências conformacionais de DD K foram estudadas por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) na presença de ambientes miméticos de membranas, como lipossomas de palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC) e de palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG). Os resultados mostraram que o DD K apresenta uma estrutura randômica em meio aquoso, porém ao se associar à membrana adota uma conformação helicoidal. Assim, a estrutura tridimensional de DD K foi estudada na presença de micelas de dodecifosfocolina (DPC) por espectroscopia bidimensional de ressonância magnética nuclear (RMN) em solução. Os resultados mostraram uma conformação  $\alpha$ -hélice anfipática a partir do sétimo resíduo e que se estende até a região C-terminal<sup>64</sup>. Atualmente, uma variedade de técnicas físico-químicas e biofísicas vem sendo desenvolvida e mesmo adaptada para o estudo da interação destes meios miméticos de membranas bacterianas e peptídeos antimicrobianos<sup>59</sup>.

Neste sentido, propõe-se neste trabalho a imobilização do peptídeo DD K sobre plataformas funcionalizadas com poli(4-ABA), com detecção impedimétrica do alvo complementar (POPC), bem como realização de estudos para avaliar o efeito do colesterol na interação do peptídeo DD K com membranas fosfolipídicas. Estes estudos contribuem ainda para explicar a baixa atividade hemolítica do peptídeo, que em grande parte, se deve à presença do colesterol em células eucariotas, já em células bacterianas ele apresenta bons resultados, o que significa que, posteriormente, é possível à sua aplicação em fármacos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Instrumentação e equipamentos

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato da AUTOLAB modelo PGSTAT 128N (*Eco Chemie*, [www.metrohm.com.br](http://www.metrohm.com.br)), apresentado na Figura 4, acoplado a um computador contendo o *software* NOVA 1.9 e o módulo FRA32M.

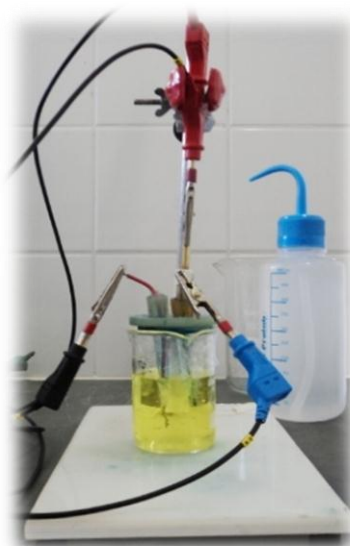


**Figura 4:** Potenciostato/Galvanostato da AUTOLAB PGSTAT 128N, utilizado para as medidas eletroquímicas.

Os experimentos eletroquímicos para geração e caracterização dos filmes poliméricos (eletropolimerização), foram conduzidos em uma célula eletroquímica com capacidade de 100,0 mL.

Os eletrodos foram inseridos na célula por entradas presentes em uma cobertura de Teflon<sup>®</sup>, conforme apresentado na Figura 5, enquanto que todos os experimentos de detecção das biomoléculas foram realizados em célula eletroquímica de um compartimento, com capacidade total de 1,0 mL.

Os potenciais foram referidos a um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 M). Como eletrodos de trabalho foram utilizados discos de grafite com área geométrica de 29,7 mm<sup>2</sup> e como eletrodo auxiliar foi usado placa de platina.



**Figura 5:** Célula eletroquímica utilizada nos experimentos de eletropolimerização.

A análise morfológica da superfície dos eletrodos, modificados com os filmes poliméricos, foi realizada através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) a partir de um microscópio de bancada apresentado na Figura 6.



**Figura 6:** Microscópio de Bancada da Hitachi High Technologies modelo TM-3000.

A água destilada foi ultrapurificada através do Ultrapurificador de água PURELAB Classic DI (ELGA), conforme mostrado na Figura 7.



**Figura 7:** Ultrapurificador de água PURELAB Classic DI (ELGA) utilizado para ultrapurificação da água utilizada nos experimentos.

#### 4.2. Preparo das soluções

Na realização dos trabalhos experimentais, os reagentes empregados foram de grau analítico e as soluções aquosas foram preparadas utilizando-se água deionizada.

Todas as soluções utilizadas no procedimento de eletropolimerização, bem como as de análise de caracterização e detecção, foram preparadas imediatamente antes de cada procedimento, e desoxigenadas com  $N_2$  por cerca de 20 minutos, antes do uso.

Segue-se descrito abaixo, o procedimento de preparo para cada solução utilizada.

***Solução de Ácido Perclórico (0,50 M):*** pipetou-se 43,20 mL de ácido perclórico ( $HClO_4$ ) concentrado (Vetec, 70%), transferiu-se o volume para um balão volumétrico de 1,0 L e aferiu-se o menisco com água deionizada.

***Solução de Ferro/Ferricianeto de Potássio (5,00 mM; contendo 0,10 M de KCl):*** pesou-se 0,1646 g de ferricianeto de potássio  $[K_3Fe(CN)_6]$  (Sigma-Aldrich, 99%); 0,2112 g de ferrocianeto de potássio triidratado  $[K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O]$  (Sigma-Aldrich, 99%) e 0,7455 g de cloreto de potássio (KCl) (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 100,0 mL e o volume completado com água deionizada.



**Solução de 4-ABA (2,50 mM):** pesou-se 0,0346 g de ácido 4-aminobenzóico (4-ABA) (Alfa Aesar, 99%), transferiu-se para um balão de 100,0 mL e o volume foi ajustado com solução aquosa de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 0,50 M.

**Solução de NaOH (0,10 M):** pesou-se 0,4000 g de hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec, 99%), transferiu-se a massa para um balão volumétrico de 100,0 mL, sendo o volume completado com água deionizada.

**Solução de Guanina e Adenina (20 mM):** pesou-se 0,00302 g de guanina ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, 99%) juntamente com 0,00270 g de adenina ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$ ) (Sigma-Aldrich, 99%) e transferiu-se para um eppendorf, sendo o volume ajustado para 1,0 mL com solução aquosa de NaOH 0,10 M.

**Solução Tampão Acetato (0,10 M; pH 4,50):** pipetou-se 2,860 mL de ácido acético ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) (Vetec, 99%) e pesou-se 6,804 g de acetato de sódio triidratado ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Isofar, 99%). Os reagentes foram transferidos para um balão volumétrico de 500,00 mL e o volume ajustado com água deionizada. Antes de completar o volume desejado, o pH da solução foi ajustado para 4,50 com solução de HCl ou NaOH 0,10 M.

**Solução Tampão Fosfato (0,10 M; pH 7,40):** pesou-se 13,40 g de fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Reagen, 99%) e 5,99 g de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 500,0 mL e o volume ajustado com água deionizada. Antes de completar o volume desejado, o pH da solução foi ajustado para 7,40 com solução de NaOH 0,10 M.

**Solução Tampão Tris-HCl (0,10 M; pH 8,0):** pesou-se 1,2120 g de Tris-HCl (Tris Buffer AR) e transferiu-se para um balão de 100,0 mL, sendo o volume completado com água deionizada. Antes de completar o volume desejado, o pH da solução foi ajustado para 8,00 com solução de HCl 0,10 M.

**Solução PoliGA (63,0  $\mu\text{M}$ ):** os oligonucleotídeos sintéticos de poliGA foram obtidos como pó liofilizados da Invitrogen<sup>®</sup>, contendo a seguinte sequência com 16 pares de base: 5'-GGGGGGGGAAAAAAA-3'. De acordo com o número de mols rotulado no frasco, o

volume foi ajustado com solução tampão Fosfato 0,10 M, pH 7,40 até a concentração desejada. Esta solução foi denominada como sonda.

**Solução PoliCT (126,0  $\mu$ M):** os oligonucleotídeos sintéticos de poliCT foram obtidos como pó liofilizados da Invitrogen<sup>®</sup>, contendo a seguinte sequência com 16 pares de base: 5'-CCCCCCCCTTTTTTTT-3'. De acordo com o número de mols rotulado no frasco, o volume foi ajustado com solução tampão Fosfato 0,10 M, pH 7,40 até a concentração desejada. Esta solução foi denominada como alvo, sendo sua concentração 2x maior do que a concentração da sonda para garantir total hibridização com a sonda.

**Solução de Azul de Metileno (5,00 x 10<sup>-4</sup> M, contendo 20 mM de NaCl):** pesou-se 0,0019 g de azul de metileno (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>ClS) (Vetec, 98-103%); 0,0117 g de cloreto de sódio (NaCl) (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com água deionizada.

**Solução de Brometo de Etídio (5,00 x 10<sup>-4</sup> M, contendo 20 mM de NaCl):** pesou-se 0,0020 g de brometo de etídio (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>) (Vetec, 97%); 0,0117 g de cloreto de sódio (NaCl) (Vetec, 99%). As massas foram transferidas para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume completado com água deionizada.

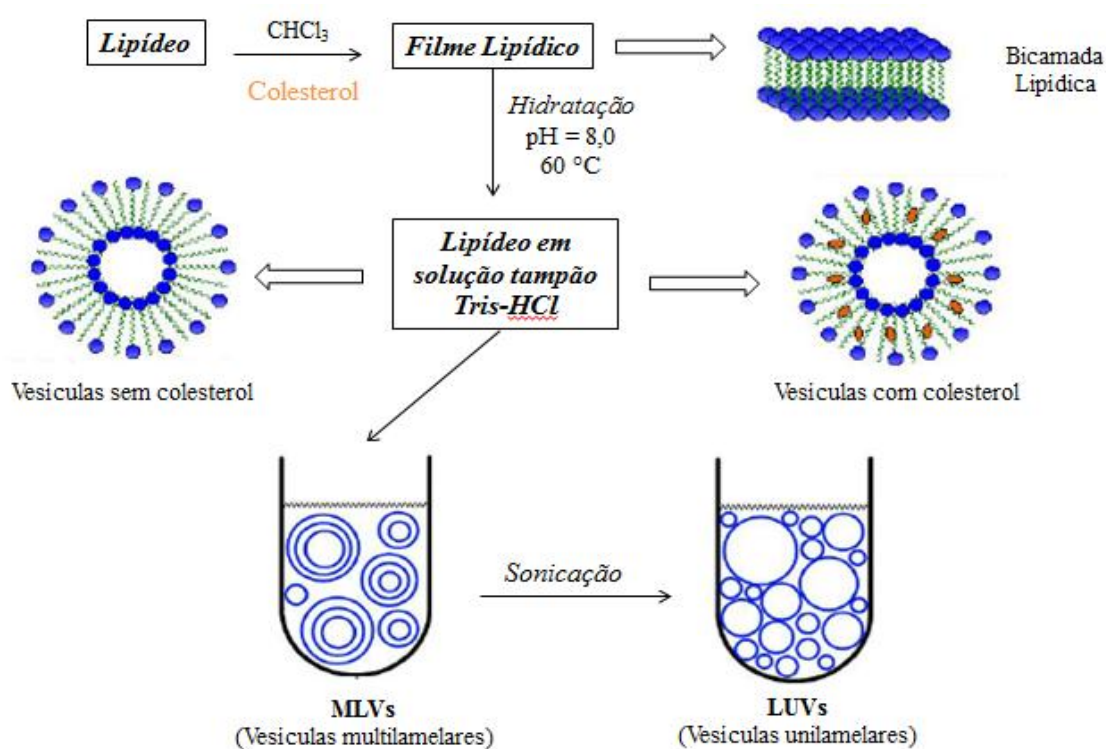
**Solução de Peptídeo DD K (6,03 x 10<sup>-4</sup> M):** pesou-se 0,0190 g da amostra de peptídeo dermadistinctina K (DD K) sintetizado e transferiu-se para um tubo de plástico, sendo o volume ajustado para 1,0 mL com solução tampão Tris-HCl 0,10 M, pH 8,0. Esta solução foi denominada como sonda.

**Solução Fosfolipídica de POPC (2,04 x 10<sup>-2</sup> M) – Obtenção de lipossomas:** Os lipossomas “fluidos” foram preparados a partir de 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC) em solução tampão. Para a realização deste procedimento, pesou-se 0,0155 g de fosfolípídeo POPC, transferiu-se para um tubo de plástico e solubilizou-se em 1 mL de clorofórmio (Vetec, 99%). Colocou-se a solução em um evaporador rotatório (RPM Fisatom) até a completa secagem do clorofórmio a uma temperatura de 60 °C. Em seguida, o volume foi ajustado para 1,0 mL com solução tampão Tris-HCl 0,10 M, pH 8,0; a solução foi colocada em um agitador magnético, em seguida em um ultrassom (Unique) por 5 minutos para a completa solubilização da amostra, repetiu-se esta última parte 3 vezes. Esta solução foi denominada como alvo

específico.

**Solução Fosfolipídica de POPC ( $2,04 \times 10^{-2}$  M) + Colesterol 43% - Obtenção de lipossomas:** Em uma primeira etapa, um filme lipídico foi preparado por meio da solubilização dos lipídeos em clorofórmio e evaporação do solvente orgânico a 60 °C, com auxílio de um evaporador rotatório, este procedimento está descrito acima. O lipossoma contendo colesterol 43% em mol foi preparado adicionando-se 0,0155 g de colesterol durante a solubilização do fosfolipídeo em clorofórmio. O filme lipídico (bicamada lipídica) foi então hidratado com solução tampão Tris-HCl 0,10 M, pH 8,0; utilizando-se um evaporador rotatório (RPM Fisatom) até a completa secagem do clorofórmio, para a formação de vesículas multilamelares (MLVs) a partir das quais foram obtidas vesículas unilamelares grandes (LUVs), por ultrasonicação de MLVs com o auxílio de um ultrassom do tipo sonda (Unique). Esta solução foi denominada como alvo não específico.

A Figura 8 apresenta uma representação esquemática das etapas de preparação dos lipossomas descritos acima.

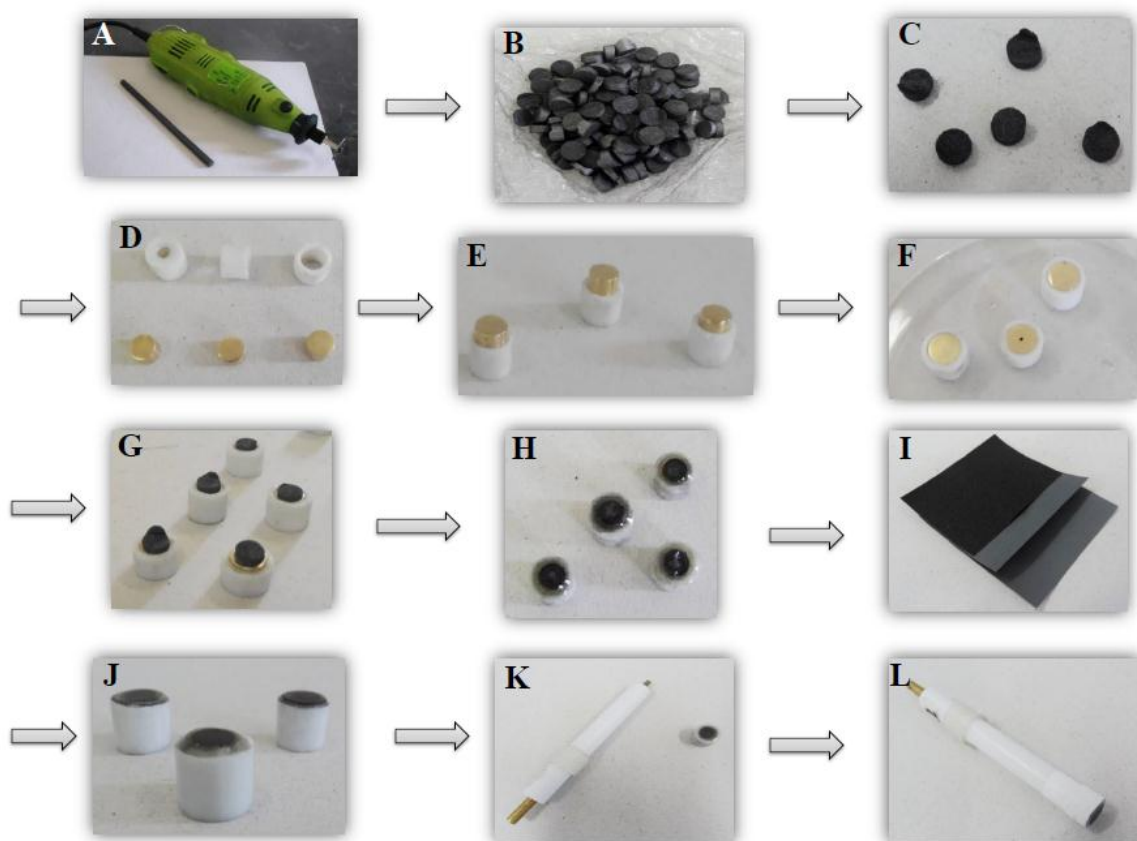


**Figura 8:** Representação esquemática das etapas de preparação dos lipossomas.

### 4.3. Procedimento experimental

#### 4.3.1. Preparação e construção dos eletrodos de trabalho

A Figura 9 apresenta as imagens das etapas de preparação dos eletrodos de grafite a serem utilizados na eletropolimerização do 4-ABA.



**Figura 9:** Procedimento de preparação dos eletrodos de grafite.

Inicialmente, barras de grafite (100 x 0,6 mm) (A), obtidas da Alfa Aesar (99,9999%), foram cortadas em tamanhos menores para a construção dos eletrodos (B), neste processo utilizou-se micro retífica e a espessura do grafite obtida foi de  $\pm 1-2$  mm (C).

Em seguida, o grafite foi colado sobre bases de latão revestidas de teflon (D-F), neste processo utilizou-se cola de prata (CW2460) para diminuir a resistência entre o grafite e o latão (G). Após o período de 1 hora utilizou-se cola Araldite® 90 minutos para preencher os espaços vazios entre o grafite e o teflon, isolando assim o latão e a cola de prata para evitar possíveis interferências dos mesmos (H).

Posteriormente, os eletrodos foram lixados em lixa d'água MIRKA™ números 200, 1500 e 2000 sucessivamente, para a remoção do excesso de Araldite® e garantir o polimento da superfície do eletrodo (I-J).

Assim, o polimento final foi realizado com suspensão aquosa de alumina 0,30 µm (Micropolish A, Buehler), então o eletrodo foi limpo em água sob banho de ultrassom (Unique) por 10 minutos, enxaguado com água destilada em abundância e seco com N<sub>2</sub> ultra puro.

Por fim, estes eletrodos de grafite foram conectados ao suporte de base condutor (K-L), para utilização e após as medidas, os mesmos eram desmontados da base de teflon, e o processo de preparo dos mesmos era reiniciado para o preparo de novos eletrodos.

#### ***4.3.2. Eletropolimerização do 4-ABA***

Antes do procedimento de eletropolimerização do 4-ABA, os eletrodos de grafite foram analisados em solução de ácido perclórico e em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio, com o objetivo de verificar a eletroatividade dos mesmos. Neste procedimento os eletrodos de grafite foram ciclados, sucessivamente com 3 ciclos de potencial, na faixa de potencial de +0,00 a +1,20 V em solução de HClO<sub>4</sub>.

Posteriormente, os eletrodos foram lavados com água deionizada, secos sob fluxo de N<sub>2</sub> e analisados em solução de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, numa faixa de potencial de -0,25 a +0,80 V. Os voltamogramas cíclicos foram registrados para posterior análise.

A eletropolimerização foi realizada através das técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e cronoamperometria. Utilizando-se a técnica de voltametria cíclica foram realizados 100 ciclos de potencial com velocidade de varredura de 50 mV/s, na faixa de potencial de +0,00 a +1,20 V. Na cronoamperometria, os eletrodos foram modificados em três potenciais constantes: 0,95 V; 1,05 V e 1,15 V, utilizando-se os tempos de polimerização de 4800 segundos e 2400 segundos.

A solução monomérica de 4-ABA na concentração de 2,50 mM em solução aquosa de HClO<sub>4</sub> 0,50 M. Após a eletropolimerização, os eletrodos contendo os filmes poliméricos de poli(4-ABA), foram lavados com água deionizada em abundância e secos sob fluxo de N<sub>2</sub>.

Posteriormente, os eletrodos modificados foram analisados em solução contendo somente o eletrólito suporte (HClO<sub>4</sub> 0,50 M) para verificação da adsorção do polímero, bem como sua atividade eletroquímica, e 5 ciclos de potencial foram realizados na mesma faixa de eletropolimerização, para a remoção do “monômero residual”.

Análises para investigar o comportamento eletroquímico do eletrodo de grafite modificado com poli(4-ABA) também foram conduzidas em solução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , na faixa de potencial de  $-0,25$  a  $+0,80$  V e em solução de  $\text{HClO}_4$  na faixa de  $+0,00$  a  $+0,80$  V.

#### ***4.3.3. Propriedades de troca iônica do poli(4-ABA)***

As propriedades de troca iônica para os eletrodos de grafite (EG) e para os eletrodos de grafite modificados com 4-ABA [Poli(4-ABA)/EG] foram investigadas pelo estudo da reação de transferência eletrônica na superfície dos eletrodos modificadas, utilizando-se o par redox denominado ferrocianeto/ferricianeto de potássio.

Medidas por voltametria cíclica foram conduzidas em solução aquosa  $5,0$  mM de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , contendo  $\text{KCl}$   $0,10$  M, na faixa de potencial de  $-0,25$  a  $+0,80$  V. Estudos também foram conduzidos somente em solução do eletrólito suporte ( $\text{KCl}$   $0,10$  M), na mesma região de potencial utilizada na investigação do par redox, a fim de verificar a contribuição da eletroatividade do filme polimérico no processo de transferência eletrônica do par redox utilizado.

#### ***4.3.4. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica***

Os espectros de impedância eletroquímica dos eletrodos de grafite modificados com poli(4-ABA), e posteriormente imobilizados com oligonucleotídeos, bem como com os peptídeos foram obtidos em solução aquosa  $5,0$  mM de  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  contendo  $\text{KCl}$   $0,1$  M. A solução de análise foi desoxigenada com nitrogênio ultra puro por cerca de  $30$  minutos. O intervalo de frequência investigado foi de  $10^6$  a  $10^{-2}$  Hz.

A amplitude de excitação senoidal foi de  $10$  mV, tendo o potencial de circuito aberto (OCP) aplicado de  $+0,24$  V, a fim de se investigar e analisar as propriedades elétricas superficiais dos eletrodos.

O ajuste dos resultados experimentais a um circuito equivalente apropriado, quando necessário, foi realizado com software provido pelo equipamento.

#### ***4.3.5. Medidas de microscopia eletrônica de varredura***

A morfologia dos filmes de poli(4-ABA) foi avaliada a partir de imagens obtidas pela

técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando-se um Microscópio de Bancada da Hitachi High Technologies, modelo TM-3000. As amostras foram submetidas a ampliações variadas e análises da rugosidade dos filmes bem como de suas principais características foram processadas e analisadas através dos softwares providos pelo equipamento.

#### ***4.3.6. Imobilização e detecção das bases púricas guanina e adenina***

Antes da realização do procedimento de imobilização e detecção das biomoléculas, registros da linha base foram obtidos em solução tampão acetato até estabilização da mesma para os eletrodos modificados. Para este procedimento, utilizou-se a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), sendo realizados 15 voltamogramas. Após o procedimento, o eletrodo foi retirado da solução tampão e seco imediatamente com fluxo de N<sub>2</sub>.

A imobilização das bases púricas foi realizada por adsorção da solução contendo Guanina e Adenina 20 mM, diretamente sobre esta superfície. Utilizou-se cerca de 20 µL da solução de Guanina e Adenina (solução contendo as duas bases), sendo este volume suficiente para cobrir toda a área do eletrodo de trabalho. Após este procedimento, o eletrodo foi mantido por 20 minutos em um dessecador. Após este período o eletrodo foi lavado em solução de tampão acetato por 6 segundos sob agitação constante, para a remoção de adsorções não específicas e seco com N<sub>2</sub>.

Medidas de detecção direta da oxidação das bases Guanina e Adenina foram realizadas em tampão acetato pH 4,50 na faixa de potencial de +0,00 a +1,40 V, utilizando-se VPD. Os parâmetros de VPD utilizados foram: amplitude: 25 mV; período do pulso: 0,20 s; velocidade de varredura: 20 mV/s.

#### ***4.3.7. Procedimento de construção do genossensor***

Antes do procedimento de imobilização das biomoléculas obteve-se a linha base do sistema contendo apenas os Poli(4-ABA)/EG, para isso os eletrodos de Poli(4-ABA)/EG foram colocados em contato com a solução tampão fosfato por cerca de 20 minutos. Este procedimento garante maior estabilização da linha base para as medidas, devido à estabilização do filme polimérico neste meio. Posteriormente, registros da linha base foram obtidos até estabilização da mesma, utilizando-se VPD, para isso foram utilizados cerca de 15 voltamogramas. Após o procedimento, o eletrodo foi retirado da solução tampão e seco

imediatamente com fluxo de N<sub>2</sub> ultra puro.

A imobilização da sonda (poliGA) foi realizada por adsorção de 20 µL da solução de poliGA diretamente sobre a superfície do eletrodo, sendo este volume suficiente para cobrir a área do eletrodo de trabalho. O eletrodo foi mantido em uma estufa a 42 °C até a evaporação da solução de poliGA, cerca de 20 minutos. Após este período o eletrodo foi lavado em solução tampão fosfato por 6 segundos, sob agitação constante, para remoção de adsorções não específicas e seco com N<sub>2</sub> ultra puro.

O procedimento de hibridização foi realizado adicionando-se a solução alvo (20 µL de poliCT), sobre a superfície do eletrodo já contendo a sonda (poliGA), mantendo-se o eletrodo a 42 °C por 20 minutos. Novamente realizou-se a lavagem em tampão fosfato por 6 segundos, e posterior secagem com N<sub>2</sub>.

Quando utilizados os intercaladores, AM ou BE, 20 µL da solução deste, foram colocados em contato com a superfície dos eletrodos ssDNA/Poli(4-ABA)/EG e dsDNA/Poli(4-ABA)/EG por 5 minutos, sendo então lavados em tampão fosfato por 6 segundos, e secos com N<sub>2</sub>. A detecção indireta do evento de hibridização foi então conduzida pelo monitoramento da eletroatividade do intercalador. Para o AM utilizou-se a redução na faixa de potencial de +0,40 a -0,80 V e para o BE a oxidação na faixa de potencial de +0,30 a +0,90 V. Os parâmetros de VPD utilizados para ambos os intercaladores foram: amplitude: 25 mV; período do pulso: 0,20 s; altura do pulso: 0,06 s; velocidade de varredura: 20 mV/s.

#### **4.3.8. Procedimento de construção do biossensor microbiológico**

Para os estudos de moléculas biológicas como os peptídeos, é necessário sintetizá-las, já que boa parte das suas fontes naturais apresenta baixa concentração destes compostos, dificultando o isolamento em quantidades suficientes para análises.

A amostra do peptídeo DD K foi sintetizada manualmente em fase sólida no laboratório LASEB/UFVJM, de acordo com a metodologia padrão de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS), via estratégia F<sub>moc</sub><sup>66</sup>. Empregou-se a resina Tenta Gel-SRAM (Iris Biotech, Marktredwitz, Alemanha) com grau de substituição 0,27 mmol/g, fornecendo o peptídeo amidado como produto final. Neste trabalho, foi estudado o peptídeo antimicrobiano dermadistinctina K (DD K) isolado previamente da pele do anfíbio *Phyllomedusa distincta*<sup>62</sup>. O efeito do colesterol na interação do peptídeo sintético DD K com lipossoma de 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC) foi investigado.



#### ***4.3.8.1. Imobilização e detecção das biomoléculas***

A estabilização dos eletrodos na solução de medida foi realizada com o mesmo procedimento utilizado na imobilização dos oligonucleotídeos. Porém, nos ensaios de imobilização e detecção do biossensor foi utilizado o tampão tris-HCl pH 8,0.

Depois de registrados os VPDs da estabilização da linha base dos Poli(4-ABA)/EG, a sonda (peptídeo DD K) foi imobilizada sobre a superfície funcionalizada. Para este procedimento, 20  $\mu$ L da solução de peptídeo DD K foram colocados sobre a superfície do eletrodo, e o mesmo foi mantido à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, o eletrodo foi lavado em solução tampão tris-HCl por 6 segundos e seco com N<sub>2</sub>.

Posteriormente, realizou-se a imobilização do alvo específico (fosfolípídeo POPC) e do alvo não específico (fosfolípídeo POPC + colesterol 43%), onde 20  $\mu$ L de cada solução foram adicionados sobre a superfície do eletrodo contendo a sonda por um período de 20 minutos à temperatura ambiente. Os biossensores foram lavados por 6 segundos em solução tampão tris-HCl e secos com N<sub>2</sub> ultra puro.

Medidas de EIE foram realizadas para detecção da superfície dos eletrodos contendo a sonda, sonda/alvo específico e sonda/alvo não específico. Os parâmetros experimentais utilizados foram os mesmos utilizados nas medidas de EIE para o Poli(4-ABA)/EG, descrita no item 4.3.4.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Filmes poliméricos derivados do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA) foram eletropolimerizados sobre eletrodos de grafite, sendo investidos juntamente com sua utilização no estudo de imobilizações de bases nitrogenadas de DNA, oligonucleotídeos e peptídeos. Estes filmes apresentaram estabilidade e interações com os materiais biológicos utilizados. Além disso, o poli(4-ABA) mostrou-se como um polímero de grande possibilidade e potencial para ser utilizado como matriz para a construção de biossensores.

As técnicas utilizadas neste trabalho para a obtenção dos filmes poliméricos foram eletroquímicas, conduzidas em meio aquoso. Para a análise e caracterização dos eletrodos modificados, e avaliação dos biossensores, foram utilizadas técnicas como: voltametria cíclica (VC), cronoamperometria (CA), voltametria de pulso diferencial (VPD) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

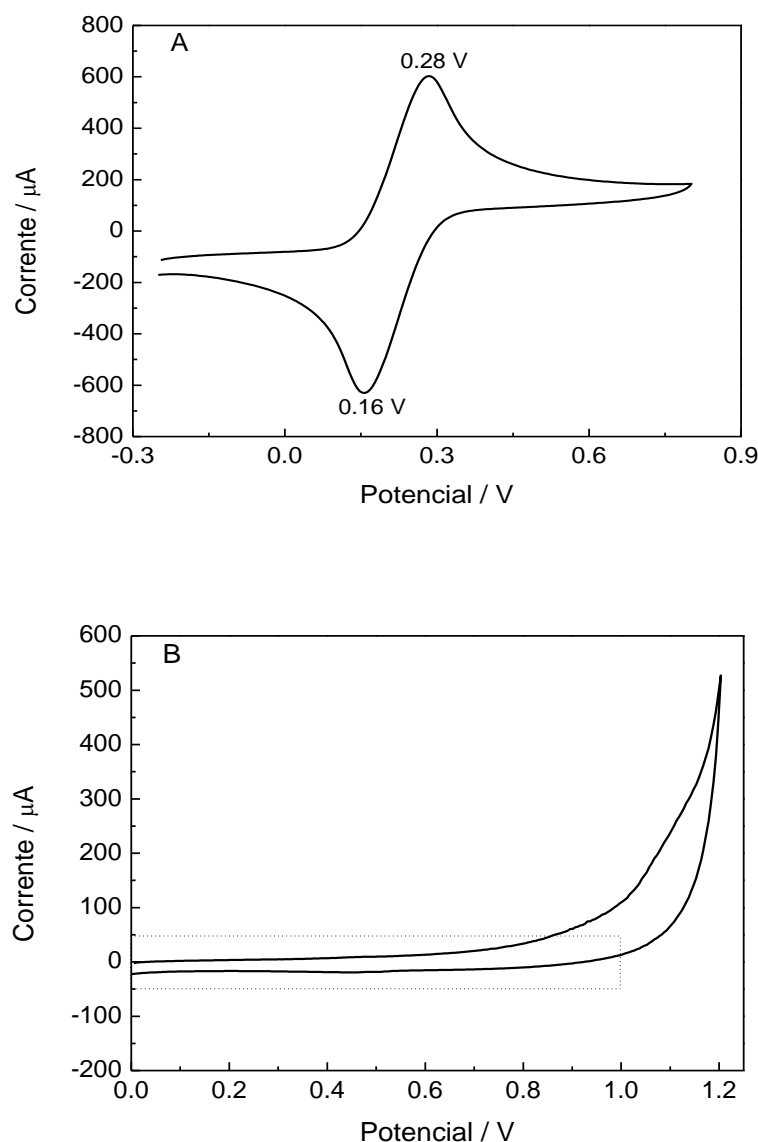
Análises complementares foram realizadas com o intuito de caracterizar morfologicamente o polímero depositado sobre o eletrodo, utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Todos os resultados obtidos encontram-se descritos e discutidos a seguir.

### 5.1. Condicionamento dos eletrodos de grafite

As condições experimentais necessárias para se obter resultados confiáveis dependem da reprodutibilidade dos sistemas. Para isso, os eletrodos de grafite devem apresentar respostas semelhantes para serem utilizados nos experimentos, bem como para efeitos de comparação nos estudos de análise química e reprodutibilidade.

Desta forma, antes do procedimento de eletropolimerização, os eletrodos de grafite foram selecionados e condicionados para o uso. No parâmetro referido como seleção, os eletrodos de grafite foram avaliados utilizando-se solução aquosa do par redox  $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$  5,0 mM contendo KCl 0,10 M como eletrólito suporte. A escolha deste par redox se deve ao fato do mesmo apresentar comportamento eletroquímico muito bem conhecido e definido, sendo considerado, portanto como um padrão eletroquímico<sup>67</sup>. Os perfis dos voltamogramas cíclicos padrão, para os eletrodos a serem utilizados na eletropolimerização, são mostrados na Figura 10A.



**Figura 10:** VC do eletrodo de grafite não modificado em: (A) solução  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5,00 mM contendo KCl 0,10 M e (B) solução  $\text{HClO}_4$  0,50 M.  $v = 100 \text{ mV/s}$ .

As medidas realizadas em solução contendo o par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio foram utilizadas como um indicativo da qualidade de resposta eletroquímica do eletrodo. Na Figura 10A pode-se observar que o eletrodo de grafite mostra um comportamento padrão ( $\Delta E = 120 \text{ mV}$ ) para o par redox. As áreas eletroquimicamente ativas dos eletrodos de grafite são os parâmetros analisados já que a concentração das espécies em solução, seus coeficientes de difusão e a velocidade de varredura não se alteram ao se medir um eletrodo contra o outro. A diferença de potencial entre os picos anódico e catódico, próxima de 100 mV, e razão das correntes de pico anódica e catódica ( $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$ ) próxima do valor unitário, permitem dizer que os eletrodos apresentam reprodutibilidade da superfície

para realização dos experimentos eletroquímicos.

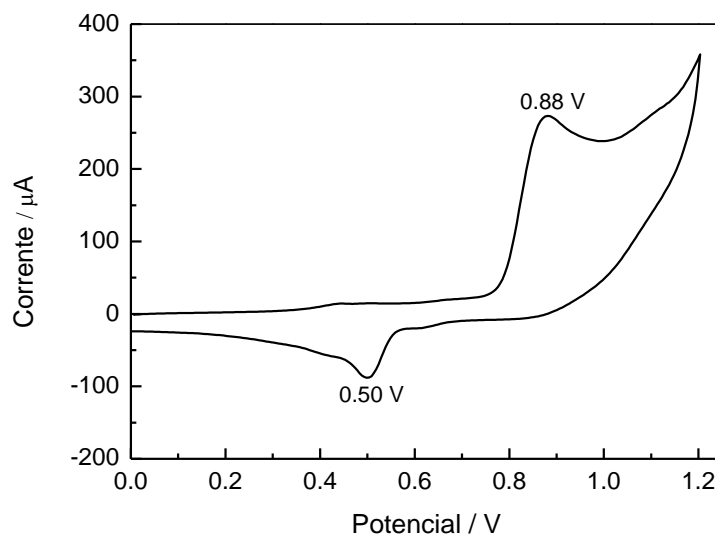
Após este procedimento, os eletrodos também foram avaliados em solução do eletrólito suporte. A medida realizada em ácido perclórico permite observar a presença ou ausência de interferentes eletroativos na superfície do eletrodo, na faixa de estudo utilizada para a eletropolimerização. Portanto, os eletrodos foram submetidos a sucessivos ciclos de varredura de potencial (cerca de 3 ciclos) na região de +0,00 a +1,20 V em solução de  $\text{HClO}_4$ , o que também pode garantir uma limpeza eletroquímica na superfície do eletrodo, para melhor utilização no processo de eletropolimerização. O perfil desejado e que foi utilizado em todos os estudos reportados neste trabalho é apresentado na Figura 10B, onde tomou-se como referência, a utilização de eletrodos que apresentavam valores de corrente inferiores a 50  $\mu\text{A}$ , obtidos na faixa de +0,00 a +1,00 V, e valores máximos de corrente em 520  $\mu\text{A}$  para os potenciais acima de +1,00 V.

Desta forma, quando os eletrodos consentiam aos critérios descritos acima, estes eram utilizados para o procedimento de eletropolimerização. Aqueles eletrodos que não satisfaziam qualquer uma das condições acima eram descartados e desmontados.

## **5.2. Eletropolimerização do 4-ABA por voltametria cíclica**

Após a seleção dos eletrodos adequados para utilização, foi realizada a investigação da região de atividade eletroquímica do 4-ABA. Desta forma, investigações preliminares sobre o comportamento eletroquímico do ácido 4-aminobenzóico foram realizadas por VC, sobre eletrodos de grafite utilizando-se ácido perclórico como eletrólito suporte.

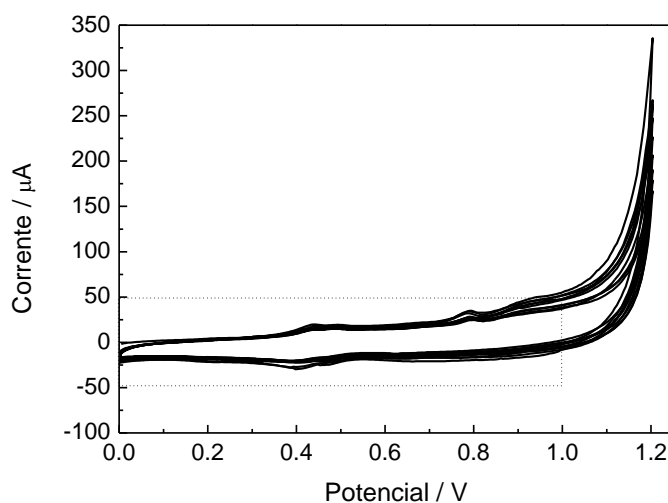
A Figura 11 mostra o voltamograma cíclico referente ao primeiro ciclo de varredura do 4-ABA. Uma onda de oxidação eletroquímica do 4-ABA pode ser observada em cerca de +0,88 V. Um processo catódico é observado em potencial de retorno por volta de +0,50 V, o qual pode ser atribuído à redução do material adsorvido na superfície do eletrodo. Isto é afirmado devido ao crescimento das correntes de pico de tais processos com sucessivos ciclos de varredura de potencial. Tal discussão será apresentada mais adiante, neste trabalho.



**Figura 11:** VC em solução 2,50 mM de 4-ABA sobre eletrodo de grafite. Eletrólito suporte:  $\text{HClO}_4$  0,50 M.  $\nu = 50 \text{ mV/s}$ .

A eletropolimerização do 4-ABA, para formação dos filmes poliméricos, foi então realizada por sucessivos ciclos de potencial, na mesma faixa de potencial apresentada no voltamograma cíclico da Figura 11.

A Figura 12 mostra o comportamento eletroquímico do EG, contendo 10 ciclos de varredura de potencial, em solução de ácido perclórico 0,50 M, na ausência do monômero.

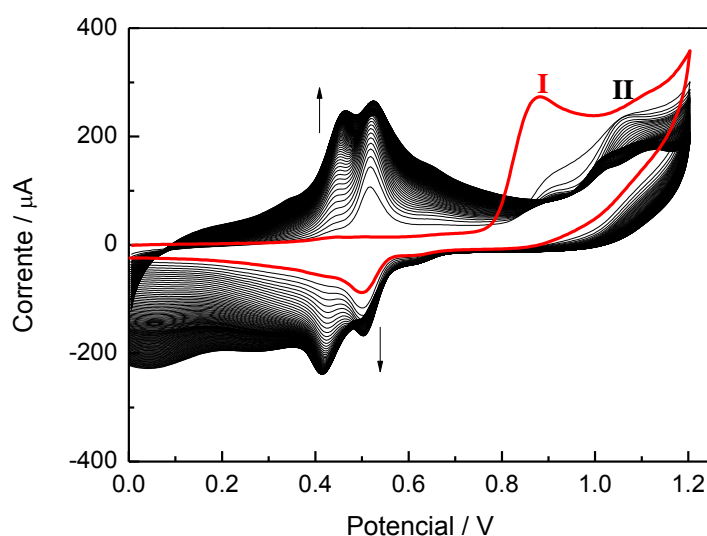


**Figura 12:** VCs consecutivos do eletrodo de grafite em solução de 0,50 M de ácido perclórico. Número de ciclos = 10;  $\nu = 50 \text{ mV/s}$ .

Na Figura 12 pode-se perceber uma baixa atividade eletroquímica quando se submete o eletrodo de grafite a consecutivos ciclos de potencial, na faixa de +0,00 a +1,20 V, somente no eletrólito suporte. Observa-se apenas um pequeno aumento da corrente capacitiva, sendo que as correntes residuais ficaram abaixo de 50  $\mu\text{A}$ .

Após a avaliação do parâmetro descrito acima, a eletropolimerização do monômero em concentração de 2,50 mM foi realizada utilizando-se 100 ciclos de potencial na faixa de +0,00 a +1,20 V, em solução de ácido perclórico 0,50 M, como eletrólito suporte. A velocidade de varredura foi mantida em 50 mV/s.

Os VCs referentes aos sucessivos ciclos de potencial do 4-ABA para o eletrodo modificado com 100 ciclos de potencial podem ser vistos na Figura 13.



**Figura 13:** VCs consecutivos do eletrodo de grafite em solução de 2,50 mM de 4-ABA. Eletrólito suporte:  $\text{HClO}_4$  0,50 M. Número de ciclos = 100;  $\nu = 50$  mV/s. Sendo: (—) 1º ciclo de potencial. As setas indicam o sentido da corrente.

Pode-se observar que o 4-ABA oxida-se de forma irreversível, e dois picos anódicos (I e II) podem ser vistos sem correspondentes processos catódicos na varredura inversa. Os picos I e II aparecem como ondas bem separadas para potenciais mais positivos, indicando, neste caso, um processo de oxidação mais favorável. Para o 4-ABA, o pico de oxidação I é observado em cerca de +0,88 V, enquanto que o segundo processo de oxidação (correspondente ao pico II) se desenvolve com um potencial mais positivo, em cerca de +1,05 V. Há formação de cátions-radicaís altamente reativos na região do pico I, necessários para iniciar a polimerização do 4-ABA, enquanto que o pico II está relacionado com o acompanhamento de reações de oxidação após o pico I. Portanto, os dois picos anódicos (em vez de um único pico de oxidação) observados nos voltamogramas cíclicos do 4-ABA,

indicam claramente um processo de oxidação mais fácil. Também é evidente que à medida que se aumenta o número de ciclos de potencial há um decréscimo nos valores da corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ). Isto implica no consumo de monômero próximo a superfície do eletrodo, para a formação e deposição do material polimérico derivado do 4-ABA.

A Figura 13 ainda mostra que, no primeiro ciclo de potencial, já se observa o aparecimento de uma onda de redução, que após o segundo ciclo se converte em duas em +0,41 e +0,50 V, potencial referente ao 100º ciclo. À medida que se realiza os sucessivos ciclos de potencial, os respectivos processos de oxidação correspondentes aparecem em +0,46 e +0,52 V. O processo redox mostra um aumento nos valores de corrente, com os sucessivos ciclos de potencial, portanto, isto indica a formação e adsorção de um material eletroativo sobre o eletrodo de grafite.

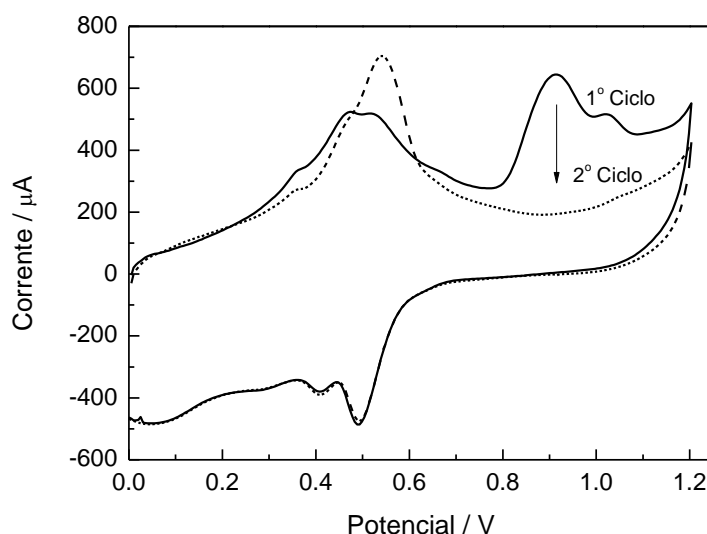
### 5.2.1. Comportamento eletroquímico dos filmes de poli(4-ABA)

Após o procedimento de eletropolimerização, os EG modificados com filmes poliméricos [poli(4-ABA)/EG], foram submetidos a ciclos de potencial na mesma faixa da eletropolimerização apresentada na Figura 13, em solução somente do eletrólito suporte. Este procedimento visa à remoção do “*monômero residual*” que pode ter sido “*aprisionado*” durante o processo de modificação eletroquímica.

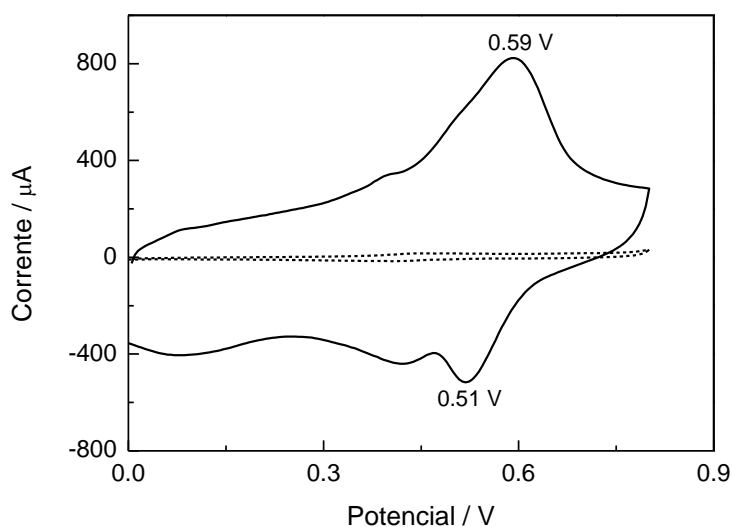
A Figura 14 exhibe dois ciclos de varredura de potencial obtido para o eletrodo modificado com poli(4-ABA), somente em solução do eletrólito suporte, após o procedimento de eletropolimerização. Os VCs foram obtidos após o eletrodo de grafite modificado com poli(4-ABA) ter sido retirado da solução monomérica, lavado em água com abundância e seco sob fluxo de  $N_2$ .

No primeiro ciclo de potencial observa-se uma forte intensidade de  $I_{pa}$  a +0,88 V, que praticamente desaparece após o segundo ciclo de varredura de potencial, ficando evidente o processo de oxidação referente ao monômero. Este monômero residual pode ter sido adsorvido durante a eletropolimerização. As intensidades de corrente relacionadas aos processos de atividade eletroquímica do filme se tornam praticamente constantes após a segunda varredura. Este procedimento de “*limpeza de monômero residual*” é um fator importante para se eliminar possíveis interferências de atividades eletroquímicas relacionadas a este processo em análises subsequentes.

A modificação do eletrodo de grafite é confirmada quando se compara os perfis eletroquímicos do EG e poli(4-ABA)/EG em solução do eletrólito suporte (ácido perclórico) (Figura 15) e em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio (Figura 16).



**Figura 14:** VC do eletrodo de poli(4-ABA)/EG após eletropolimerização, somente em solução de  $\text{HClO}_4$  0,50 M, para a remoção do monômero residual. Sendo: (—) 1º ciclo de potencial e (---) 2º ciclo de potencial.  $\nu = 100 \text{ mV/s}$ .



**Figura 15:** VC obtido após a eletropolimerização, somente em solução de ácido perclórico 0,50 M, na ausência do monômero, para os eletrodos de grafite: (---) eletrodo não-modificado e (—) modificado com poli(4-ABA).  $\nu = 100 \text{ mV/s}$ .

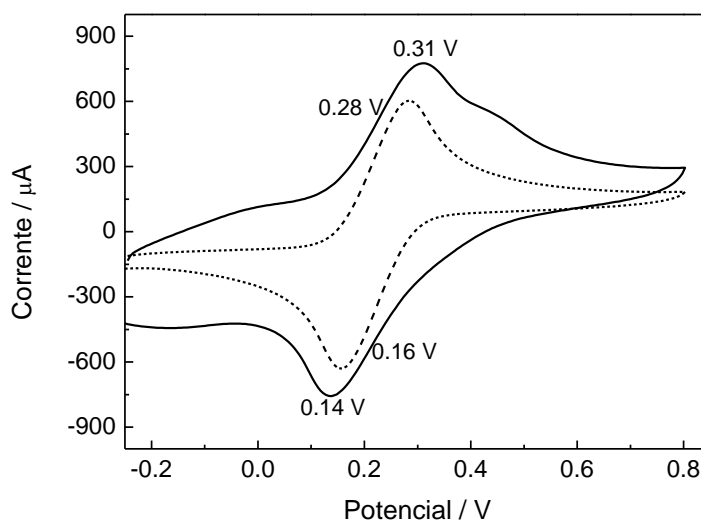
A Figura 15 mostra a região de atividade eletroquímica do eletrodo modificado com poli(4-ABA), comparado a do eletrodo não-modificado, em solução do eletrólito suporte,  $\text{HClO}_4$  0,50 M. Através da Figura 15, pode-se comprovar que houve uma alteração na



resposta eletroquímica do eletrodo de grafite após o procedimento de eletropolimerização, sendo avaliada para o eletrodo modificado uma alta eletroatividade do material adsorvido em cerca de +0,59/+0,51 V. Isto implica que o material eletropolimerizado fica adsorvido sobre a superfície do eletrodo e apresenta uma atividade redox, uma vez que esta atividade está na mesma região observada na Figura 13.

### 5.2.2. Propriedades de transferência de carga dos filmes de poli(4-ABA)

Para investigar as propriedades cinéticas de transporte de troca iônica dos filmes poliméricos de poli(4-ABA), voltamogramas cíclicos foram registrados em solução aquosa contendo sonda redox aniônica, denominada ferrocianeto/ferricianeto de potássio. Os VCs obtidos estão apresentados na Figura 16.



**Figura 16:** VCs obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica dos eletrodos de grafite em solução aquosa de  $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$  5,0 mM contendo KCl 0,10 M: (---) eletrodo não-modificado e (—) modificado com poli(4-ABA).  $\nu = 100$  mV/s.

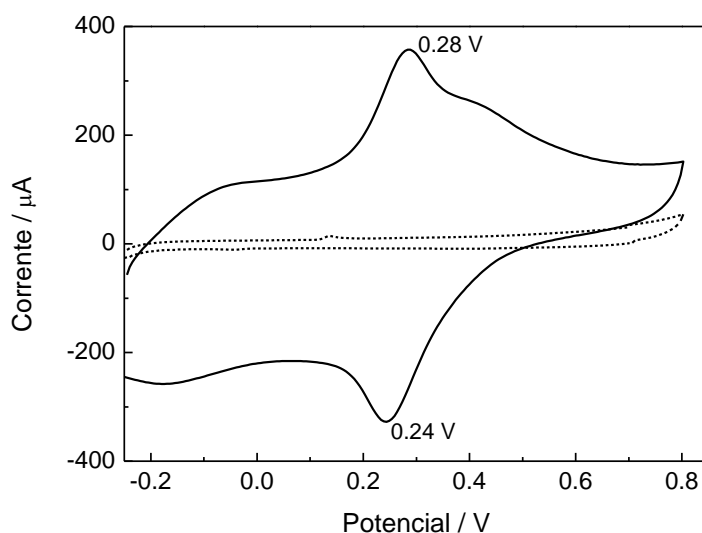
Quando uma substância eletroativa é adsorvida na superfície de um eletrodo, as propriedades de transferência eletrônica do sistema são afetadas. A capacidade no bloqueio de eletrodos modificados no processo de transferência eletrônica tem sido usualmente avaliada no estudo das reações redox utilizando-se o complexo de ferrocianeto/ferricianeto de potássio como sonda redox de investigação<sup>68</sup>.

A natureza das interações do poli(4-ABA) com a sonda redox fornece importantes informações sobre a própria estrutura do material polimérico. Isto é devido às interações

eletrostáticas que podem existir entre a sonda redox e o polímero, permitindo prever um conhecimento prévio das propriedades elétricas do poli(4-ABA). A voltametria cíclica é uma importante técnica para investigar as propriedades de bloqueio do filme de poli(4-ABA) utilizando a difusão do par redox como sonda.

Como pode se observar na Figura 16, o EG mostra um comportamento eletroquímico com  $\Delta E = 120$  mV, para o par redox aniônico. Em contraste, para o eletrodo de grafite contendo o poli(4-ABA) é observado um  $\Delta E = 170$  mV, indicando que o perfil voltamétrico do par redox é afetado pela presença do poli(4-ABA) na superfície do eletrodo. Além disso, foram observados valores maiores de  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  quando compara-se ambos os perfis voltamétricos, além de um deslocamento no potencial de pico de oxidação, para potenciais mais positivos o que indica a modificação na superfície do eletrodo de grafite.

A Figura 17 apresenta o comportamento eletroquímico do EG e Poli(4-ABA)/EG, em solução de KCl 0,10 M.



**Figura 17:** VCs obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica dos eletrodos de grafite em solução de KCl 0,10 M: (---) EG e (—) poli(4-ABA)/EG.  $\nu = 100$  mV/s.

Tal observação é importante de se relatar, pois conforme observado na Figura 15, o filme polimérico apresenta eletroatividade, e esta pode ser influenciada pelo eletrólito suporte. Na Figura 16, pode-se observar que há um comportamento de bloqueio imperfeito para o poli(4-ABA)/EG, ou seja, não há um bloqueio total na transferência eletrônica do par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio. Desta forma, na Figura 17, o filme polimérico apresenta eletroatividade na mesma região observada na Figura 16, pode-se afirmar então que, nos VCs

obtidos na sonda redox há contribuição de ambos os processos (filme polimérico + sonda redox).

Desta forma, pela Figura 17, é evidente que o filme polimérico apresenta um comportamento redox quando imerso somente em solução de KCl 0,10 M na mesma região do par  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ . Isto evidencia que o VC da Figura 17 apresenta uma contribuição do filme polimérico. Assim, é claramente observado que para o eletrodo modificado, o filme polimérico apresenta eletroatividade na solução do eletrólito suporte, apresentando um pico de oxidação em +0,28 V e outro de redução em +0,24 V ( $\Delta E = 40$  mV). Já para o eletrodo de grafite não-modificado, nenhuma atividade eletroquímica é observada. Esta eletroatividade do poli(4-ABA) em solução do eletrólito suporte é aproximadamente na mesma região do par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio como pode ser visto na Figura 16.

### **5.3. Investigação da eletropolimerização do 4-ABA por cronoamperometria**

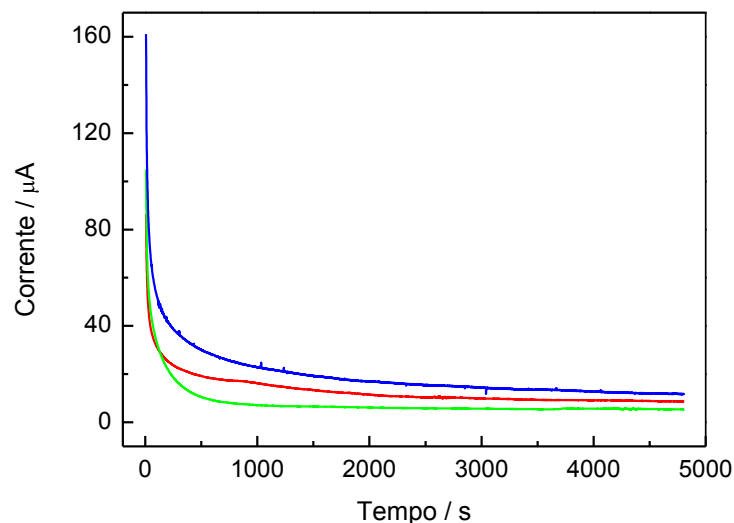
A eletropolimerização do 4-ABA também foi conduzida por Cronoamperometria para fins de comparação com a VC. Na CA se aplica um potencial, pré-estabelecido, onde ocorrem as reações de oxidação e/ou redução das espécies em solução sobre os eletrodos. Nesta, tanto o tempo de polimerização como o potencial aplicado são parâmetros que podem ser controlados.

#### ***5.3.1. Eletropolimerização do 4-ABA por cronoamperometria a 4800 segundos***

A eletropolimerização do 4-ABA por CA foi avaliada para fins de comparação com a eletropolimerização realizada por VC. Desta forma, para manter-se a comparação, a eletropolimerização a potencial constante foi avaliada durante 4800 segundos, partindo deste tempo, uma vez que é o tempo necessário para a realização dos 100 ciclos consecutivos de potencial, aplicados na voltametria cíclica.

Para a obtenção do poli(4-ABA), utilizando-se a técnica de CA, a eletropolimerização foi realizada em três potenciais distintos. A escolha destes potenciais ocorreu a partir do potencial de +1,05 V, que é o potencial correspondente ao 2º pico anódico do 4-ABA quando eletropolimerizado por VC, o qual está relacionado com o acompanhamento de reações de oxidação após o 1º pico. Este potencial está registrado no segundo voltamograma cíclico observado na Figura 13. Sobre este potencial, variou-se  $\pm 10$  mV, assim os três potenciais estabelecidos para serem aplicados à técnica de CA foram: +0,95 V; +1,05 V e +1,15 V.

Os cronoamperogramas registrados para estes três potenciais, para fins de eletropolimerização do 4-ABA, são mostrados na Figura 18. A eletropolimerização do monômero foi realizada na mesma concentração realizada por VC (2,50 mM de 4-ABA), o tempo da eletropolimerização para os três potenciais foi mantido em 4800 segundos.



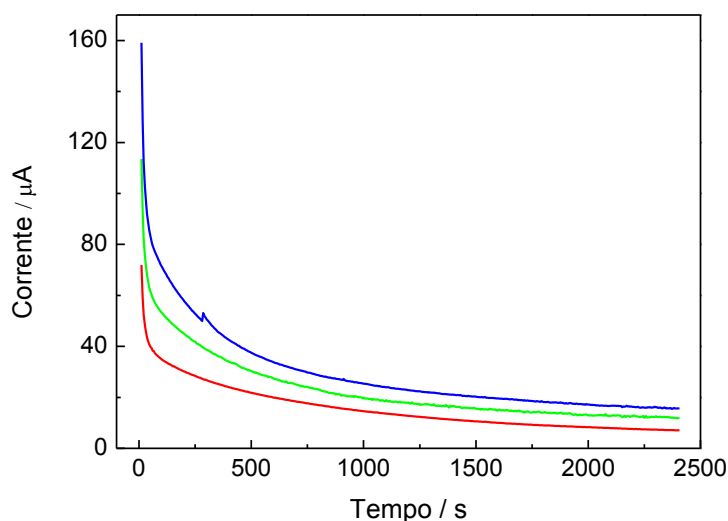
**Figura 18:** Cronoamperogramas obtidos para eletropolimerização dos EG em solução de 2,50 mM de 4-ABA. Eletrólito suporte:  $\text{HClO}_4$  0,50 M. Potenciais aplicados: (—) +0,95 V, (—) +1,05 V, (—) +1,15 V. Tempo: 4800 s.

Na Figura 18, pode-se observar que dentre os três potenciais pré-estabelecidos, o que apresenta maior intensidade de corrente é o potencial de +1,05 V, ou seja, apresenta maior quantidade de carga depositada sobre a superfície do eletrodo, uma vez que a carga é proporcional à quantidade de material e resposta eletroquímica na superfície do eletrodo, seguido dos potenciais de +1,15 V e +0,95 V, respectivamente.

### 5.3.2. Eletropolimerização do 4-ABA por cronoamperometria a 2400 segundos

Visando realizar uma otimização no processo de eletropolimerização e compará-lo ao de VC, realizou-se a variação do tempo de eletropolimerização por CA. Desta forma, o tempo de eletropolimerização investigado foi reduzido pela metade, ou seja para 2400 segundos, para fins de verificar se haveria alterações nas respostas obtidas.

A Figura 19 apresenta os cronoamperogramas obtidos para a eletropolimerização do 4-ABA nos potenciais +0,95 V; +1,05 V e +1,15 V, durante 2400 segundos.

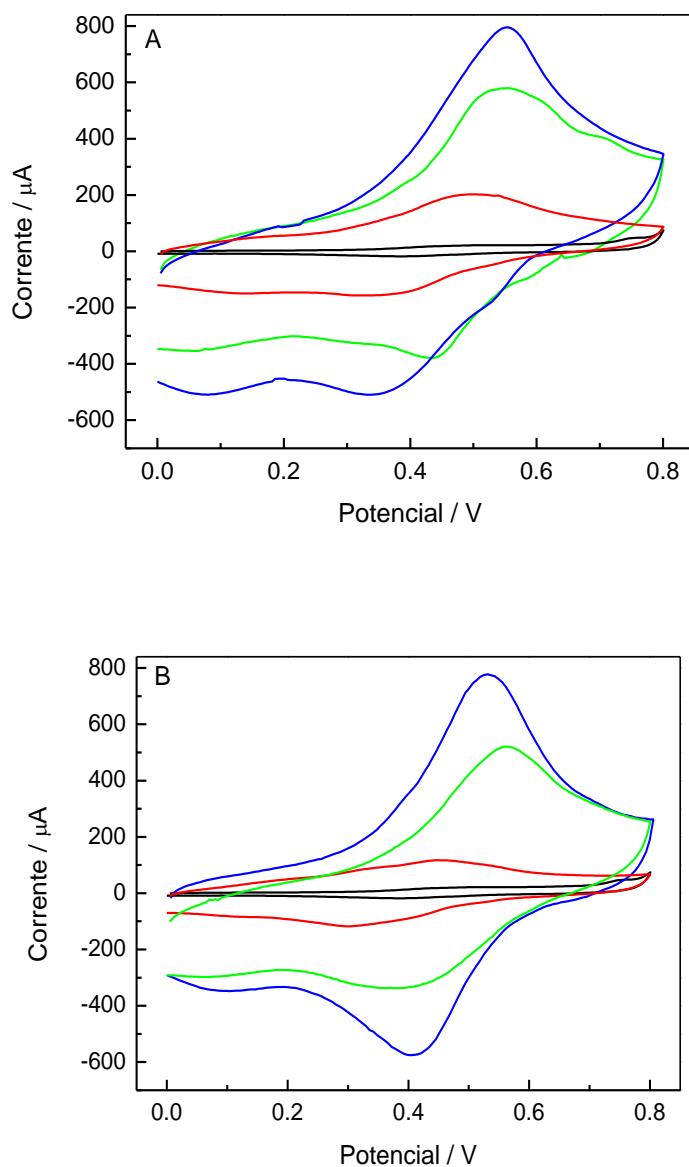


**Figura 19:** Cronoamperogramas obtidos a partir da eletropolimerização dos EG em solução de 2,50 mM de 4-ABA. Eletrólito suporte:  $\text{HClO}_4$  0,50 M. Potenciais aplicados: (—) +0,95 V, (—) +1,05 V, (—) +1,15 V. Tempo: 2400 s.

Para a obtenção do poli(4-ABA), foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 5.3.1, alterando-se apenas o tempo de eletrodeposição, fixando-se este em 2400 segundos. Pode-se observar que dentre os três potenciais pré-estabelecidos, o que apresenta maior intensidade de corrente utilizando-se o tempo de 2400 segundos é também o potencial de +1,05 V, como ocorre para o tempo de 4800 segundos, seguido dos potenciais de +1,15 V e +0,95 V, respectivamente.

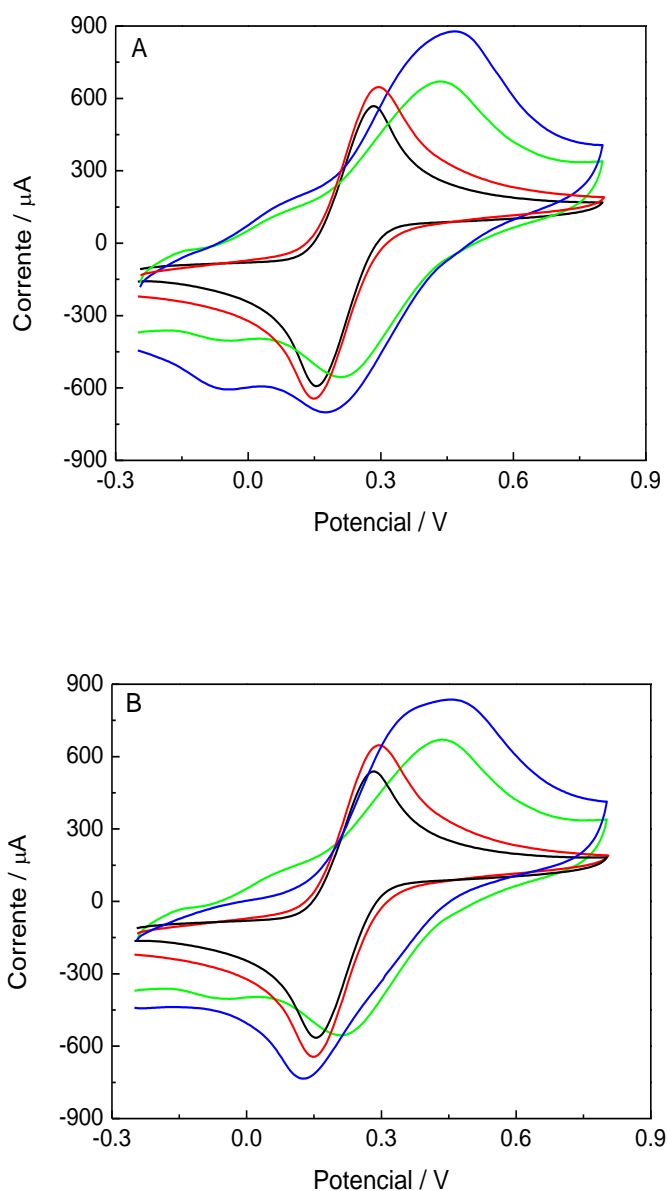
### 5.3.3. Avaliação das propriedades eletroquímicas dos filmes de poli(4-ABA)

A Figura 20 mostra a região de atividade eletroquímica dos eletrodos modificados com poli(4-ABA) comparados aos dos eletrodos não-modificados, somente em solução do eletrólito suporte  $\text{HClO}_4$  0,50 M, para as eletropolimerizações realizadas nos três potenciais constantes e nos tempos de 4800 segundos e 2400 segundos.



**Figura 20:** VCs dos eletrodos modificados em solução de ácido perclórico 0,50 M. Sendo: (—) poli(4-ABA)/EG +0,95 V, (—) poli(4-ABA)/EG +1,05 V, (—) poli(4-ABA)/EG +1,15 V e (---) EG.  $v = 100$  mV/s. Onde (A) Tempo: 4800 s e (B) Tempo: 2400 s.

A modificação do eletrodo de grafite é confirmada quando se compara os perfis eletroquímicos do EG e poli(4-ABA)/EG em solução do eletrólito suporte  $\text{HClO}_4$  (Figura 15), e em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio (Figura 21).



**Figura 21:** VCs obtidos para medidas das propriedades de troca aniônica para os eletrodos de grafite em solução aquosa de  $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$  5,0 mM contendo KCl 0,10 M. Sendo: (—) poli(4-ABA)/EG +0,95 V, (—) poli(4-ABA)/EG +1,05 V, (—) poli(4-ABA)/EG +1,15 V e (---) EG.  $\nu = 100$  mV/s. Onde (A) Tempo: 4800 s e (B) Tempo: 2400 s.

Através da Figura 20 pode-se comprovar que houve uma alteração na resposta eletroquímica do eletrodo de grafite após o procedimento de eletropolimerização, tanto para o tempo de 4800 segundos quanto para o de 2400 segundos, sendo avaliada para os eletrodos modificados uma alta eletroatividade do material adsorvido. Isto implica que o material eletropolimerizado fica adsorvido sobre a superfície do eletrodo.

Investigações do comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados também foram efetuadas em solução aquosa contendo  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5,00 mM e KCl 0,10 M como eletrólito suporte. Alterações nos perfis de oxirredução do par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio podem fornecer importantes informações a respeito do material depositado sobre a superfície do eletrodo.

Para a investigação das propriedades cinéticas de transporte de troca iônica dos filmes poliméricos de poli(4-ABA), eletropolimerizados a 2400 segundos e compará-los aos obtidos em 4800 segundos, voltamogramas cíclicos foram registrados em solução aquosa contendo a sonda redox aniônica ferrocianeto/ferricianeto de potássio.

Na Figura 21 observou-se os VCs dos eletrodos não-modificados e dos eletrodos modificados com poli(4-ABA) em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio 5,0 mM, contendo KCl 0,10 M como eletrólito suporte, para as eletropolimerizações realizadas nos três potenciais constantes e nos tempos de 4800 segundos e 2400 segundos.

Através da Figura 21 pode-se observar que para os filmes formados no potencial +0,95 V, há um ligeiro aumento da corrente na atividade do par redox, sendo observado também que um maior deslocamento de potencial ocorreu para os potenciais +1,05 V e +1,15 V. Maiores influências no potencial de pico da sonda redox, bem como na corrente, ocorreram para os eletrodos modificados no potencial +1,05 V, seguido do potencial +1,15 V, sugerindo que uma maior quantidade do filme polimérico foi adsorvida nestas plataformas, e consequente maior atividade eletroativa de influência na sonda redox.

Verifica-se que o aumento na atividade eletroquímica frente ao par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio, pode estar associado à maior quantidade de material depositado sobre a superfície do eletrodo. O que faz com que a eletroatividade do filme polimérico seja somada a do par redox, conforme já previamente discutido no item 5.2.2.

Por fim, observa-se que os VCs registrados na Figura 21A e 21B são muito semelhantes. Isto indica que, a atividade eletroquímica dos filmes poliméricos é praticamente da mesma magnitude quando a eletropolimerização por CA ocorre a 4800 segundos e 2400 segundos. Portanto, conclui-se que, uma vez que a atividade eletroquímica dos filmes poliméricos não sofre alterações em função do tempo de eletrodeposição, é viável realizar a eletropolimerização por CA utilizando o tempo menor de 2400 segundos, o que minimiza custo de operação bem como tempo de produção das plataformas funcionalizadas. Contudo, deve ser observada a resposta da plataforma frente à imobilização de biomoléculas, e isto será discutido mais à frente.

Através dos resultados obtidos até então, fica evidente que as técnicas de VC e CA são



eficientes no processo de eletropolimerização do monômero 4-ABA, assim, pela aplicação destas técnicas, comprovou-se a modificação na superfície dos eletrodos, confirmada pelas alterações na resposta eletroquímica do eletrodo de grafite após o procedimento de eletropolimerização, ou seja, pela observação da eletroatividade eletroquímica dos eletrodos de EG contendo os filmes poliméricos derivados do 4-ABA.

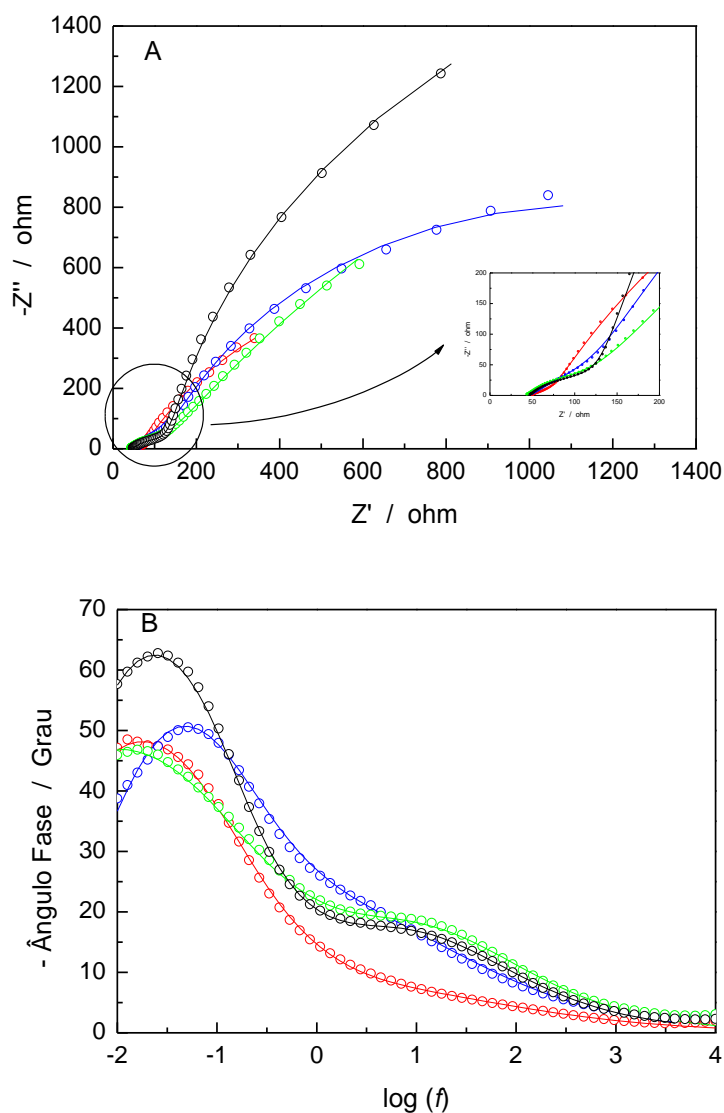
#### 5.4. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma das técnicas mais poderosas e sensíveis para investigação das propriedades elétricas da superfície de eletrodos modificados<sup>69</sup>. A EIE permite a obtenção de informações dos diferentes processos eletroquímicos interfaciais e suas constantes de tempo, sendo possível associar estes processos a componentes elétricos como resistores, capacitores ou indutores, tal que o entendimento do comportamento elétrico do sistema como um todo seja possibilitado.

Medidas de EIE foram realizadas para melhor compreensão das propriedades elétricas dos filmes de poli(4-ABA) para os eletrodos modificados nos potenciais de +0,95V; +1,05V e +1,15V, durante o tempo de 4800 segundos. Estas medidas foram comparadas com os estudos do eletrodo modificado com poli(4-ABA) através da técnica de VC.

A Figura 22 exibe os espectros de impedância eletroquímica, conhecidos como diagramas do plano complexo (Nyquist) e de Bode dos eletrodos EG e poli(4-ABA)/EG. O Diagrama de Nyquist (gráfico de  $Z'$  vs.  $Z''$ ) é muito utilizado, sendo uma poderosa ferramenta para mensurar a resistência à transferência de carga em reações eletroquímicas<sup>69</sup>.

Todas as medidas foram obtidas no potencial de circuito aberto (OCP), sendo este estipulado em +0,24 V, em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio. Em solução da sonda redox, nesta região de potencial de +0,24 V, a corrente é faradáica com contribuições dos processos redox do filme e do par redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , conforme já previamente discutido no item 5.2.2.

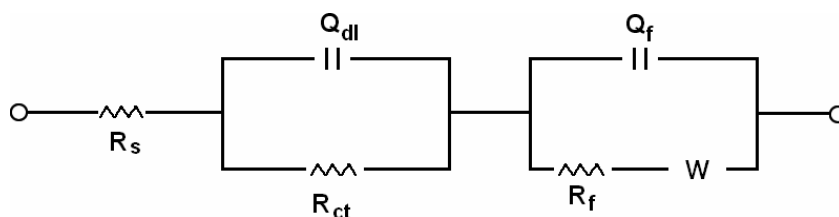


**Figura 22:** Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) dos espectros de impedância eletroquímica do EG e poli(4-ABA)/EG, obtidos em solução de  $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$  5,00 mM contendo KCl 0,10 M. Sendo: (—) +0,95 V, (—) +1,05 V, (—) +1,15 V e (—) VC.  $E_{pa} = 0,24$  V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência:  $10^6$  a  $10^{-2}$  Hz. As linhas sólidas representam o ajuste dos dados experimentais a um circuito equivalente.

Para todos os eletrodos investigados observa-se que os sistemas apresentam dois semicírculos, um na região de altas frequências e outro na região de baixas frequências, como fica evidente pelas duas constantes de tempo observadas no diagrama de Bode (Figura 22B). Na região de altas frequências o semicírculo é muito discreto para o filme polimérico formado no potencial 0,95 V, isto indica baixa eficiência no processo de eletropolimerização para este potencial, cujo material apresenta um aspecto menos condutor conforme discutido no item 5.2.2.

O comportamento de impedância verificado em regiões de baixas frequências é caracterizado pelas propriedades intrínsecas da interface polímero/solução (por exemplo, dupla camada elétrica), em conjunto com a difusão pelo transporte de massa da sonda redox na camada de difusão, que é representado geralmente por o elemento de difusão de Warburg (W).

Os dados experimentais obtidos pelas medidas de EIE da Figura 22 foram simulados pelo ajuste de uma versão modificada do circuito de Randles, a fim de se obter o comportamento eletroquímico do filme polimérico em adição ao processo de difusão. Os elementos do circuito foram:  $R_s$  é a resistência ôhmica descompensada exibida pela solução do eletrólito,  $R_{ct}$  e  $R_f$  são as resistências associadas à transferência de carga que ocorre na interface eletrodo/solução e a resistência ôhmica da estrutura do filme, respectivamente. A  $Q_{dl}$  é o elemento de constante de fase que descreve o comportamento de pseudocapacitância da dupla camada eléctrica e  $Q_f$  é o elemento de constante de fase que representa a pseudocapacitância do filme polimérico. O processo de difusão foi descrito pelo elemento Warburg (W). Assim, o melhor circuito proposto e utilizado na simulação, é o representado por  $R_s(R_{ct}Q_{dl})(Q_f[R_fW])$ , de acordo com a representação de Boukamp, mostrado esquematicamente na Figura 23.



**Figura 23:** Circuito equivalente proposto para a simulação dos dados experimentais das medidas de EIE.

Os parâmetros numéricos obtidos pela simulação dos dados experimentais, utilizando-se o circuito equivalente mostrado na Figura 23, estão apresentados na Tabela 1.

Como pode ser observado, os valores da resistência ôhmica total são consideradas praticamente constantes ( $\approx 42 - 48 \, \Omega \, \text{cm}^2$ ) para as eletropolimerizações obtidas nos diferentes eletrodos. Por outro lado, a resistência a transferência de carga ( $R_{ct}$ ), é fortemente influenciada pelas condições de electropolimerização, sendo que as resistências mais baixas e mais altas, foram verificadas para poli(4-ABA)/EG formados por CA a +0,95V e +1,05 V, respectivamente. Um alto valor de  $R_{ct}$  também foi verificado para o filme eletrosintetizado por VC, quando comparado aos formados por CA em +0,95 V e +1,15V.

**Tabela 1:** Parâmetros obtidos a partir dos resultados de simulação de EIE para os EG e poli(4-ABA)/EG eletropolimerizados em função da técnica eletroquímica.

Parâmetro	CA/+0,95 V	CA/+1,05 V	CA/+1,15 V	VC
$R_s/\Omega \text{ cm}^2$	47,5	46,4	42,8	46,1
$R_{ct}/\Omega \text{ cm}^2$	91,3	157,3	77,2	104,6
$Q_{dl}/\text{m}\Omega^{-1} \text{ s}^n \text{ cm}^{-2}$	11,8	3,85	1,71	1,92
$n_{dl}$	0,35	0,48	0,58	0,56
$R_f/\text{k}\Omega \text{ cm}^2$	0,20	1,39	3,53	2,26
$Q_f/\text{m}\Omega^{-1} \text{ s}^n \text{ cm}^{-2}$	18,5	6,67	7,31	7,87
$n_f$	1,00	0,95	0,67	0,96
$W/\text{m}\Omega^{-1} \text{ s}^{0.5} \text{ cm}^{-2}$	7,64	8,76	2,76	2,94
$\chi^2 \times 10^{-3}$	1,00	5,47	3,52	1,48

Uma vez que a  $R_{ct}$  medida no potencial de equilíbrio do eletrodo verificado para a sonda redox, é de fato uma medida indireta da densidade de corrente de troca ( $I_0 = RT/nFR_{ct}$ ) para a reação redox de esfera externa, na interface eletrodo modificado/solução, os resultados experimentais apresentados na Tabela 1, indicam que as propriedades eletrônicas intrínsecas dos filmes poliméricos são afetadas pelas condições de eletropolimerização.

De acordo com os resultados anteriormente obtidos por VC, a ocorrência de uma difusão ( $W$ ), acompanhada por uma transferência de carga ( $R_{ct}$ ) caracteriza um comportamento quase-reversível exibida pela reação no eletrodo de esfera externa que ocorre na interface polímero/solução. Como pode ser visto, o transporte de massa é ligeiramente afetado pelas condições de eletropolimerização, sendo a maior resistência à transferência de massa, verificada para o filme polimérico eletroformado por CA em +1,05 V. Os pequenos valores de  $W$  indicam que a difusão linear semi-infinita, ocorre em um meio não restrito, isto é, estes resultados indicam que a superfície do filme polimérico é mais plana do que porosa.

Os valores de  $R_f$  foram afetadas pelas condições de eletropolimerização. Assim, assumindo que a resistividade intrínseca dos filmes poliméricos, sintetizados em diferentes condições, não é uma função da espessura do filme, pode ser proposto que a espessura relativa da película de polímero para as diferentes condições foram +1,15 V > VC > +1,05 V > +0,95 V.

Portanto, de acordo com os estudos de EIS a espessura dos filmes pode ser controlada usando diferentes potenciais, no caso de CA, ou pelo uso de diferentes ciclos de potencial, no

caso de VC. A análise dos valores de  $Q_f$  ( $n_f = 0,67-1,00$ ), o que caracteriza um comportamento capacitivo, revela uma boa consistência interna com os outros parâmetros de impedância. O valor mais elevado  $Q_f$  foi verificado para o filme polimérico que exibiu a menor  $R_f$  (CA: +0,95 V), ou seja, do ponto de vista teórico a resistência do filme é uma função linear da espessura do filme, enquanto a capacitância do filme é uma função inversa da espessura.

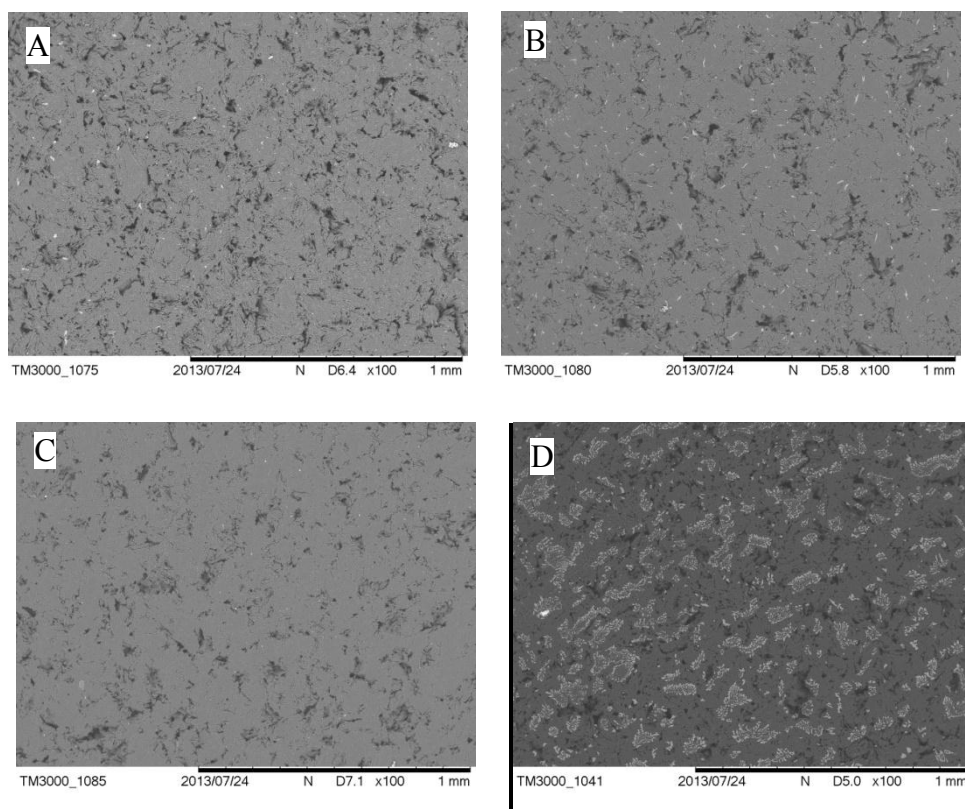
O valor de chi-quadrado é refletido como uma medida estatística que diz em que medida os valores observados se desviam do valor esperado. É um teste não paramétrico, ou seja, não depende dos parâmetros populacionais, como média e variância. O princípio básico deste método é comparar proporções, isto é, as possíveis divergências entre as frequências observadas e esperadas para certo evento. Portanto, os circuitos apresentaram razoáveis valores de chi-quadrado ( $\chi^2$ ), na ordem de  $10^{-3}$ , o sistema então é estável com o tempo e apresenta um bom ajuste dos dados experimentais, apoiando um baixo erro estatístico na simulação dos dados experimentais.

Assim, os resultados encontrados nos estudos de EIE mostraram a eficiência desta técnica para a caracterização de superfícies modificadas através da avaliação simples de um processo que envolve a transferência de carga de uma espécie eletroativa sobre a superfície do eletrodo.

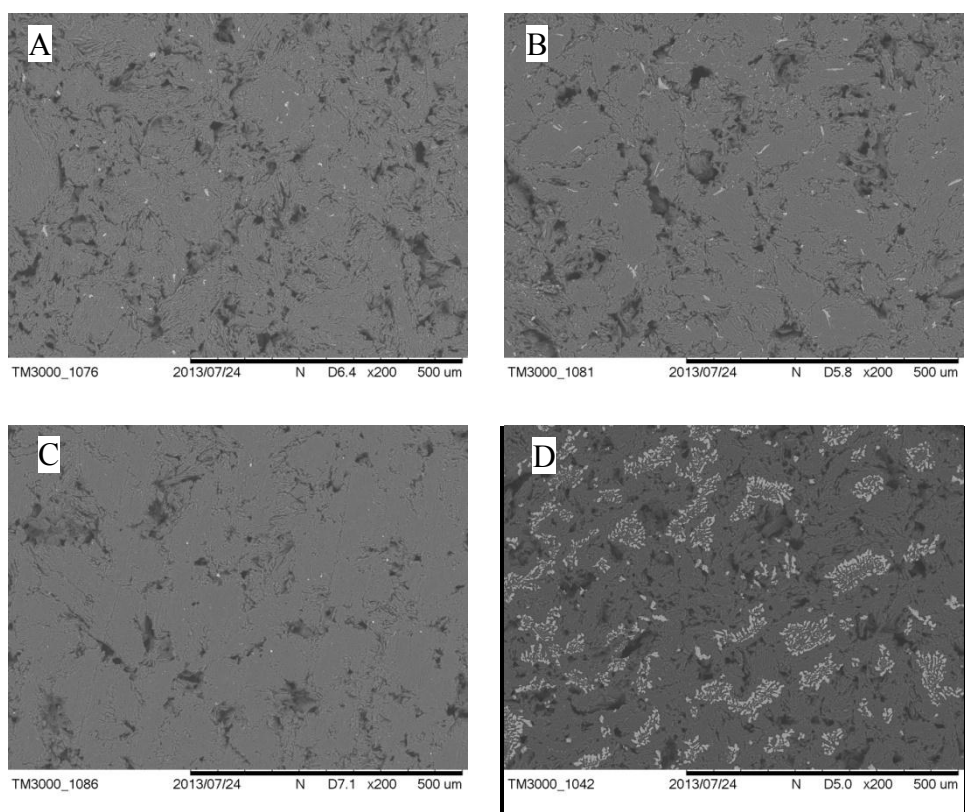
### 5.5. Análises da microscopia eletrônica de varredura

Foram realizadas análises da morfologia para todos os eletrodos de grafite modificados. Tais análises foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), com ampliações de 100x, 200x, 500x, 1000x e 2000x para cada eletrodo.

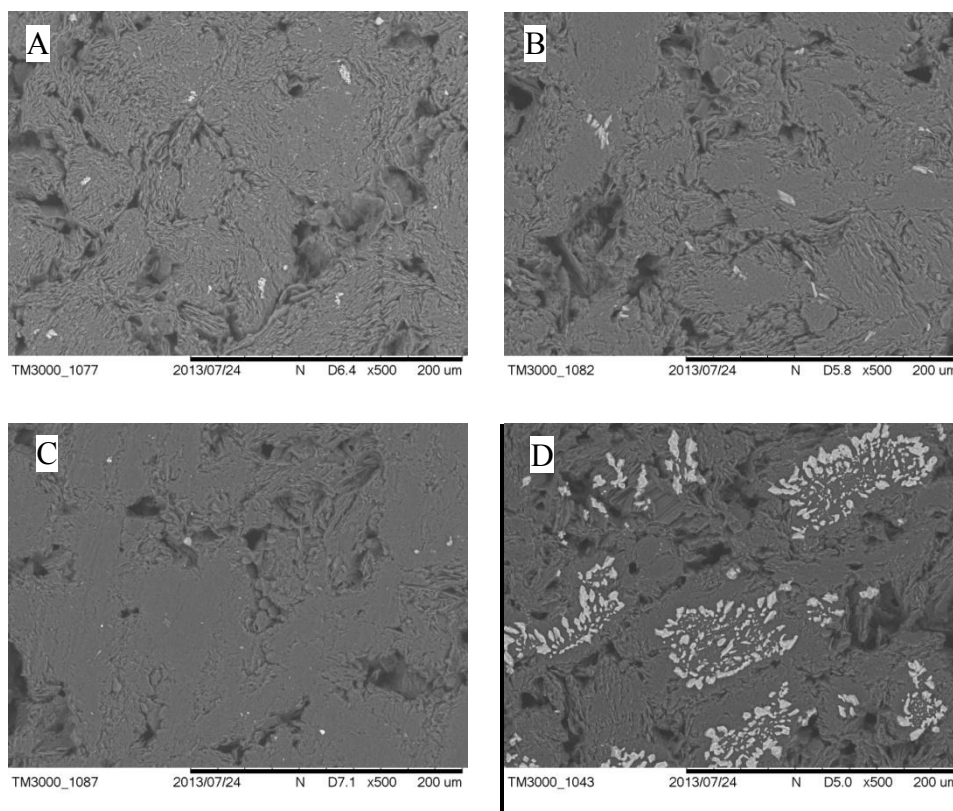
Nas Figuras 24 a 28, são apresentadas as imagens referentes a todas as ampliações realizadas, respectivamente, para os eletrodos modificados na seguinte ordem: +0,95 V; +1,05 V; +1,15 V para as eletropolimerizações utilizando a CA, conduzidas a 4800 segundos em comparação aos eletrodos modificados por VC.



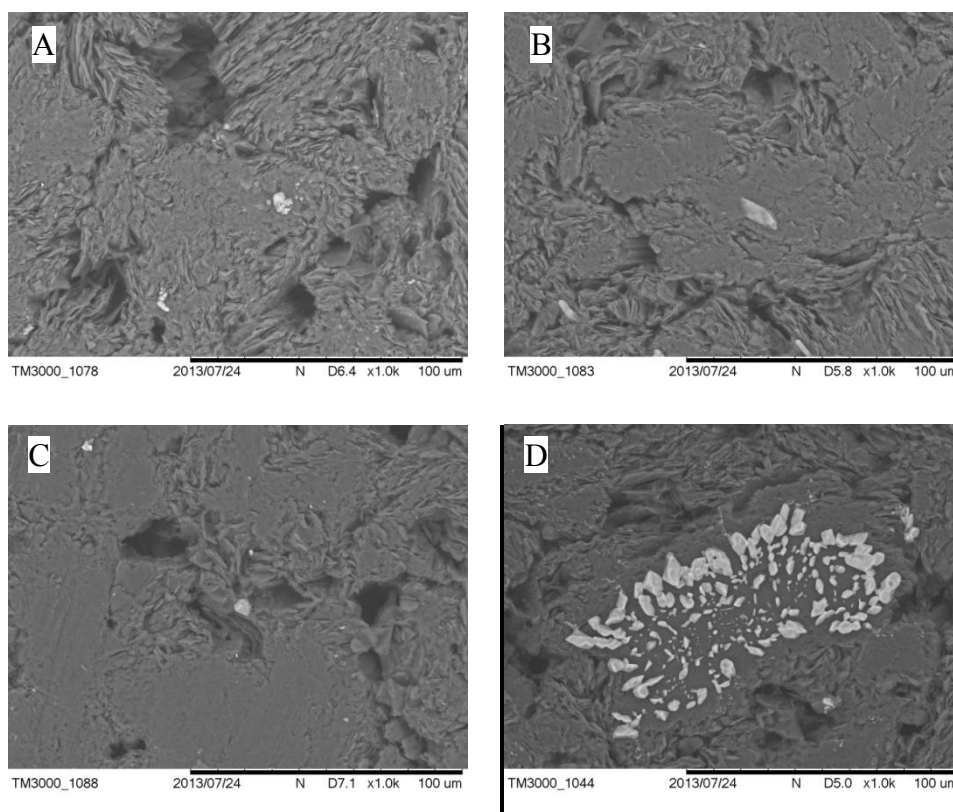
**Figura 24:** Imagens de MEV para Poli(4-ABA)/EG obtidos em: (A) +0,95 V; (B) +1,05 V; (C) +1,15 V e (D) VC. Ampliação de 100x.



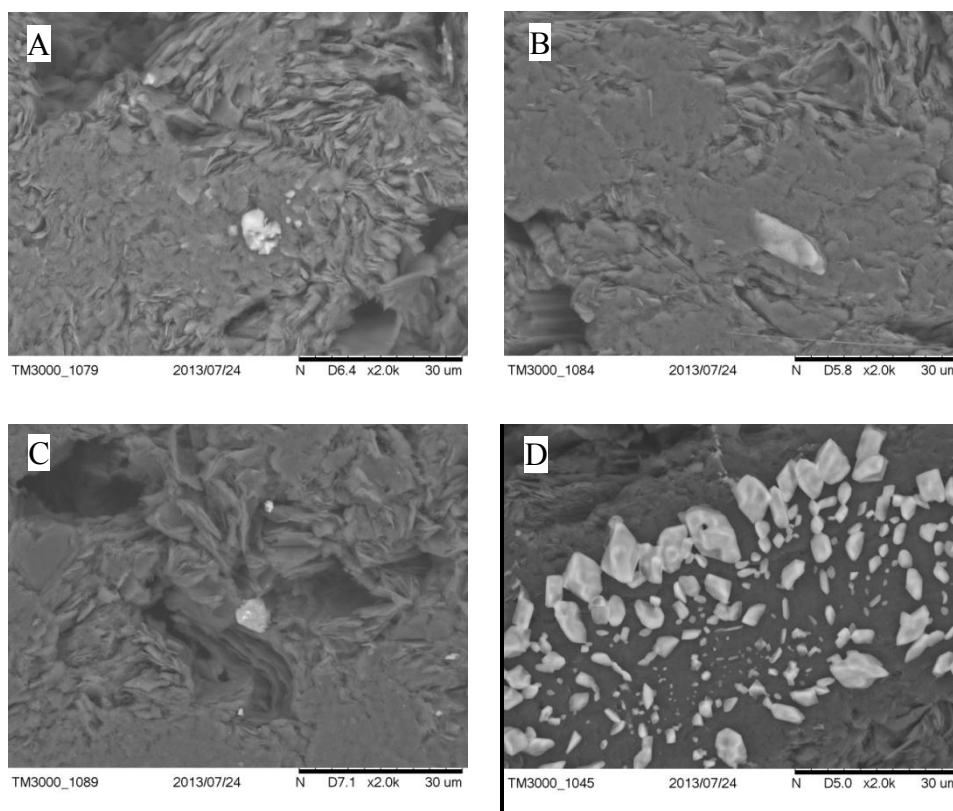
**Figura 25:** Imagens de MEV para Poli(4-ABA)/EG obtidos em: (A) +0,95 V; (B) +1,05 V; (C) +1,15 V e (D) VC. Ampliação de 200x.



**Figura 26:** Imagens de MEV para Poli(4-ABA)/EG obtidos em: (A) +0,95 V; (B) +1,05 V; (C) +1,15 V e (D) VC. Ampliação de 500x.



**Figura 27:** Imagens de MEV para Poli(4-ABA)/EG obtidos em: (A) +0,95 V; (B) +1,05 V; (C) +1,15 V e (D) VC. Ampliação de 1000x.



**Figura 28:** Imagens de MEV para Poli(4-ABA)/EG obtidos em: (A) +0,95 V; (B) +1,05 V; (C) +1,15 V e (D) VC. Ampliação de 2000x.

As imagens obtidas por MEV mostram que em todos os casos não há total recobrimento da superfície do grafite, superfície essa caracterizada pela presença intensa de imperfeições. Nas Figuras 24-28 é evidente a diferença nas propriedades morfológicas dos filmes obtidos por VC e CA. Contudo, para os filmes formados durante o tempo de 4800 segundos, observa-se uma maior presença de material depositado para a plataforma desenvolvida em +1,05 V (Figura 30) quando comparado aos demais potenciais. Para os eletrodos obtidos por VC é evidente a diferença de morfologia apresentada, sendo que nestes visivelmente é observada uma maior quantidade de material depositado.

Desta forma, pode-se observar claramente o efeito da técnica de eletropolimerização bem como do potencial na eletrogeração, na morfologia dos filmes poliméricos. Isto demonstra que o melhor potencial, o qual gera um material polimérico mais eletroativo derivado do 4-ABA por CA no tempo de 4800 segundos, é o potencial de 1,05 V, sobre a superfície do eletrodo de grafite. Neste potencial, maiores intensidades na atividade eletroquímica, bem como maior quantidade de material depositado são observadas.

Observa-se também, que o eletrodo modificado por VC, apresenta uma morfologia completamente distinta dos demais eletrodos, pois se observa uma maior cobertura da superfície do grafite. Conclui-se então que as imagens obtidas por MEV corroboram com os



resultados de caracterização eletroquímica do Poli(4-ABA)/EG, apresentados e discutidos anteriormente.

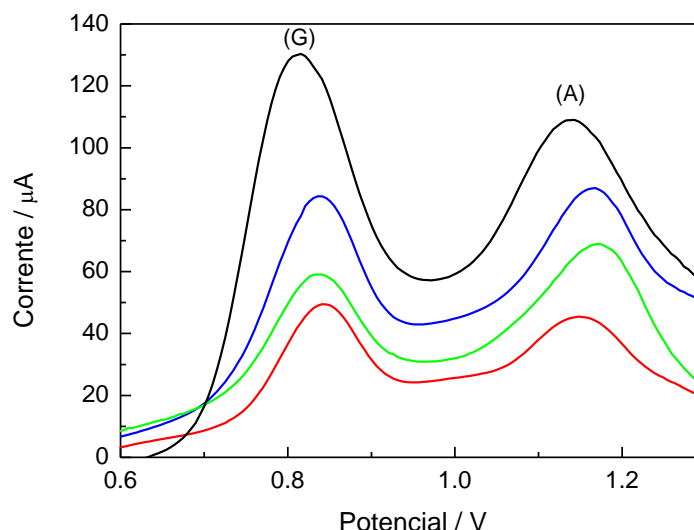
### 5.6. Imobilização e detecção de guanina e adenina

A detecção direta dos processos de imobilização é baseada nos sítios de oxidação das bases nitrogenadas presentes ao longo de uma sequência de DNA. É bem conhecido que dentre as bases do DNA, a guanina é utilizada como biomarcador usual para biossensores por apresentar o menor potencial de oxidação entre as demais bases.

A técnica eletroquímica utilizada nestes estudos foi a voltametria de pulso diferencial (VPD). Esta técnica foi escolhida por ser uma técnica que apresenta maior sensibilidade do que a voltametria cíclica e, até mesmo, do que a voltametria de pulso normal, se tratando de eletrodos sólidos como os EG utilizados neste trabalho. Essa diferença de sensibilidade ocorre especialmente quando compostos orgânicos estão envolvidos nos processos eletroquímicos. Como estes conduzem frequentemente à adsorção no eletrodo, é possível que uma técnica diferencial discrimine os efeitos que são mais ou menos constantes antes e depois da aplicação do pulso<sup>70</sup>.

A Figura 29 mostra os picos de oxidação da adenina e da guanina obtidos por voltametria de pulso diferencial (VPD) para os eletrodos de grafite modificados com poli(4-ABA) formados por VC e CA a partir dos três potenciais estudados anteriormente, os quais são: 0,95 V; 1,05 V e 1,15 V, durante 4800 segundos e por VC com 100 ciclos consecutivos de potencial.

Observa-se diferentes valores de corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) para todos os eletrodos modificados. A oxidação da guanina ocorre em cerca de +0,83 V para os três eletrodos modificados a potencial constante, enquanto que para o eletrodo modificado por VC, a oxidação da guanina pode ser observada no potencial +0,81 V. Já a oxidação da adenina ocorre em cerca de +1,15 V para os três eletrodos modificados a potencial constante e em cerca de +1,13 V para o eletrodo modificado por VC. Como pode ser observado, há um pequeno deslocamento dos potenciais de oxidação das bases púricas analisadas para os eletrodos modificados por CA.



**Figura 29:** VPDs obtidos para a oxidação direta das bases adenina e guanina imobilizadas sobre os Poli(4-ABA)/EG, obtidos em: (—) +0,95 V, (—) +1,05 V, (—) +1,15 V e (—) VC. Tempo de deposição por CA: 4800 s. Número de ciclos: 100 ciclos. Eletrólito: tampão acetato 0,10 M em pH 4,50.

Na Figura 29 verifica-se que maiores amplitudes na corrente de pico anódica foram obtidas para o eletrodo modificado por VC. Enquanto que para os eletrodos modificados por CA, maiores amplitudes na corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) foram obtidas para o potencial 1,05 V, seguido dos potenciais 1,15 V e 0,95 V, respectivamente.

A Tabela 2 apresenta as amplitudes referentes às correntes de pico anódicas, obtidas para a detecção de cada base nitrogenada imobilizada sobre os eletrodos de poli(4-ABA)/EG, modificados por VC e por CA (4800 segundos).

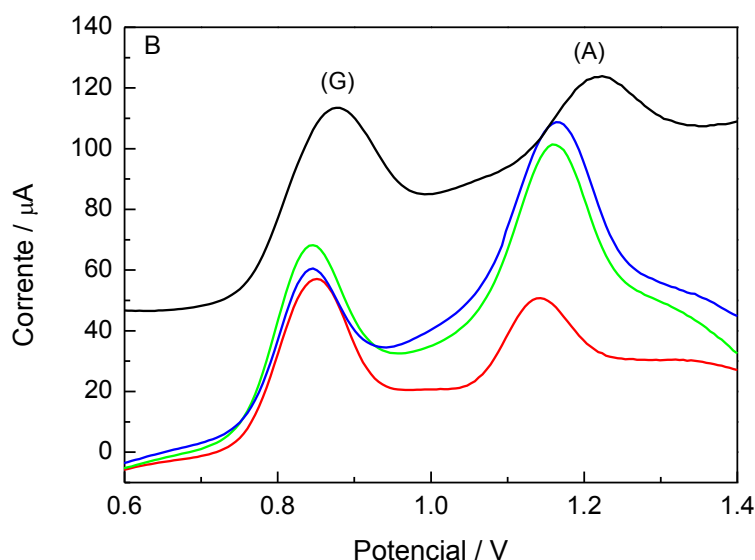
**Tabela 2:** Valores de  $I_{pa}$  obtidos para detecção de guanina e adenina imobilizadas sobre Poli(4-ABA)/EG, obtidos por VC e CA (4800 s).

$I_{pa}$ / Eletrodo	0,95 V	1,05 V	1,15 V	VC
Corrente de oxidação da Guanina ( $\mu A$ )	48,95	84,17	59,15	129,80
Corrente de oxidação da Adenina ( $\mu A$ )	45,24	86,71	68,54	108,90

Na Tabela 2 pode-se observar que quando a modificação do EG é realizada por VC, a quantidade das bases púricas imobilizadas na superfície do eletrodo é maior. Quando se compara os eletrodos modificados por CA, o EG modificado no potencial de 1,05 V se mostrou mais eficiente, em cerca do dobro de corrente registrada para a detecção das bases purinas, frente aos demais potenciais. Tais resultados estão de acordo com as análises

anteriores e mostram a técnica de VC como mais eficiente tanto para a geração do poli(4-ABA) como também para imobilização e detecção das bases purinas, adenina e guanina.

Na Figura 30, pode-se observar a resposta eletroquímica das bases púricas, quando imobilizadas sobre plataformas de poli(4-ABA), eletrogeradas a potencial constante durante 2400 segundos.



**Figura 30:** VPDs obtidos para a oxidação direta das bases adenina e guanina imobilizadas sobre os Poli(4-ABA)/EG, obtidos em: (—) +0,95 V, (—) +1,05 V, (—) +1,15 V. Tempo de deposição por CA: 2400 s. Eletrólito: tampão acetato 0,10 M em pH 4,50.

Como observado nos VCs formados por CA durante o tempo de 4800 segundos, verifica-se que maiores amplitudes na corrente de pico anódica foram obtidas para o eletrodo modificado por VC.

Na Figura 30 pode-se verificar que as amplitudes na corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) para a detecção da guanina foram praticamente constantes para os eletrodos preparados a 2400 segundos e inferiores quando comparados aos eletrodos preparados a 4800 segundos (ver Figura 29). Contudo, para a detecção da adenina, maiores amplitudes na  $I_{pa}$  foram observadas, quando comparados aos VCs da Figura 29, para o eletrodo preparado a 1,05 V. Isto indica que a característica do material biológico pode influenciar diretamente na escolha da plataforma funcionalizada, tendo-se este parâmetro como fator fundamental para investigação da sensibilidade do biossensor.

A oxidação da guanina ocorre em cerca de +0,83 V e da adenina em cerca de +1,15 V, para os três eletrodos modificados a potencial constante, assim como foi observado para os eletrodos modificados durante o tempo de 4800 segundos. Enquanto que para o eletrodo

modificado por VC, a oxidação da guanina ocorre em cerca de +0,87 V e da adenina em cerca de +1,21 V. Desta forma, pode-se afirmar que para os eletrodos modificados a potencial constante não houve deslocamento no potencial de oxidação das bases em função do tempo de eletrodeposição.

A Tabela 3 apresenta as amplitudes referentes às correntes de pico anódicas ( $I_{pa}$ ) de cada base nitrogenada estudada, para os eletrodos modificados por CA, no tempo de 2400 segundos.

**Tabela 3:** Valores de  $I_{pa}$  obtidos para detecção de guanina e adenina imobilizadas sobre poli(4-ABA)/EG, obtidos por VC e CA (2400 s).

$I_{pa}$ / Eletrodo	+0,95 V	+1,05 V	+1,15 V	VC
Corrente de oxidação da Guanina ( $\mu A$ )	56,83	60,40	68,15	113,70
Corrente de oxidação da Adenina ( $\mu A$ )	50,29	108,33	100,85	123,90

Como para todos os eletrodos investigados, condições como: quantidade de guanina e adenina imobilizadas, concentração das bases nitrogenadas e tempo de imobilização foram as mesmas, conclui-se que a característica da plataforma influencia diretamente na imobilização e detecção da biomolécula, ou seja, quando compara-se os resultados das Tabelas 2 e 3, é observado que a guanina é melhor detectada em filmes formados por CA com 4800 segundos e a adenina teve maior sensibilidade para as plataformas desenvolvidas a 2400 segundos, exceto para o eletrodo preparado em +0,95 V.

Desta forma, como a VC mostrou-se de modo geral, mais eficiente na imobilização das biomoléculas, todos os eletrodos que foram utilizados na imobilização de oligonucleotídeos, bem como de peptídeos e seus recombinantes, foram conduzidas somente com eletrodos modificados por VC.

## 5.7. Aplicação das plataformas de poli(4-ABA) em genossensores

A imobilização das biomoléculas é a etapa mais importante na construção de um biossensor, garantindo sensibilidade, seletividade e estabilidade ao mesmo. O objetivo de qualquer metodologia de imobilização é reter a máxima atividade da biomolécula na superfície do transdutor<sup>25</sup>.

Os genossensores podem utilizar de interações covalentes de oligonucleotídeos com as cadeias poliméricas, minimizando efeitos de lixiviação das sondas, sendo que as mudanças decorrentes da hibridização podem ser detectadas, utilizando-se métodos eletroquímicos de

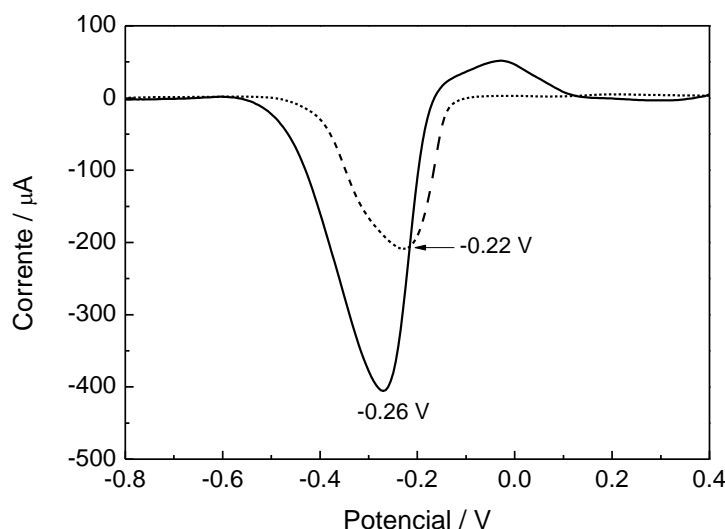
detecção direta das bases nitrogenadas componentes do DNA ou via indireta, utilizando-se intercaladores de duplas fitas do DNA. Assim, este sistema é viável e interessante, visto que simplifica a construção do sensor e não requer elaboradas sínteses para a funcionalização de polímeros condutores<sup>71</sup>.

Investigações foram conduzidas utilizando-se os filmes poliméricos derivados do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), obtidos por VC, como plataformas para a imobilização de oligonucleotídeo (poliGA), bem como a imobilização e detecção do evento de hibridização com o alvo complementar (poliCT). Os resultados experimentais, para verificação da viabilidade do processo de imobilização e hibridização foram obtidos por meio de voltametria de pulso diferencial, utilizando-se a detecção indireta pelo uso de agentes intercaladores como o AM e BE, uma vez que, conforme apresentado nas Figuras 29 e 30 os potenciais para detecção direta destas bases são altos, e podem trazer efeitos indesejáveis no processo de detecção, como oxidação de outras espécies que apresentam um processo redox em potenciais inferiores em relação às bases purinas.

#### ***5.7.1. Imobilização e detecção de oligonucleotídeos sobre EG/4-ABA, utilizando-se azul de metileno como indicador***

No processo de imobilização de oligonucleotídeos, é necessário que as plataformas utilizadas sejam reprodutíveis, estáveis e seletivas. Isso é importante para o desenvolvimento de dispositivos simples para detecção de alvos complementares. Para esse tipo de aplicação, a transdução eletroquímica da superfície de hibridização apresenta uma perspectiva atrativa em termos de rapidez na análise, instrumentação simples, custo e possibilidade de miniaturização. Vários intercaladores têm sido utilizados em biossensores de hibridização de DNA, sendo um deles é o azul de metileno.

A adsorção do azul de metileno foi previamente investigada sobre os eletrodos EG e Poli(4-ABA)/EG. A Figura 31 mostra o voltamograma de pulso diferencial obtido para os eletrodos EG e Poli(4-ABA)/EG modificado por VC, após 5 minutos em contato com 20 µL de AM  $5,0 \times 10^{-4}$  M.



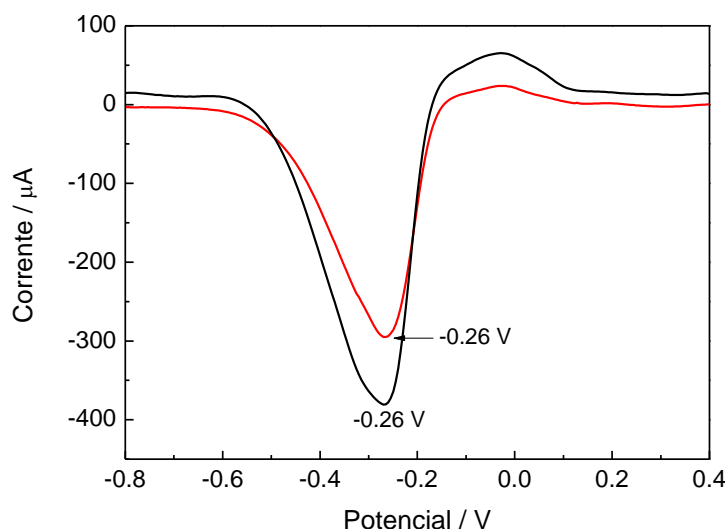
**Figura 31:** VPDs obtidos para: (---) EG e (—) poli(4-ABA)/EG contendo 20  $\mu\text{L}$  de AM  $5,0 \times 10^{-4}$  M. Eletrólito: Tampão fosfato 0,10 M, pH 7,40. Amplitude: 25 mV; Período do Pulso: 0,20 s; Altura do Pulso: 0,06 s;  $v = 20$  mV/s. Tempo de adsorção<sub>AM</sub> = 5 minutos.

Na Figura 31 observa-se que nas mesmas condições de imobilização o AM apresenta uma grande afinidade pela superfície do eletrodo modificado [poli(4-ABA)/EG]. O aumento de 200% no valor de corrente observado pode estar relacionado à característica aniônica do filme de poli(4-ABA). Isso causaria a atração eletrostática entre o polímero e o AM, ficando este adsorvido na superfície do poli(4-ABA)/EG e resultando no aumento nos valores de corrente de pico catódica ( $I_{pc}$ ). Observa-se também um deslocamento de potencial em cerca de 40 mV para potenciais mais anódicos, o que está relacionado com a atuação do poli(4-ABA) no processo de transferência eletrônica.

Deste modo, a detecção de hibridização foi acompanhada pela redução do AM, onde a eletroatividade deste composto leva à interpretação da forma híbrida da sonda.

É bem conhecido que o AM tem uma alta afinidade pela base nitrogenada guanina. Desta forma, é possível fazer o reconhecimento do evento de hibridização, uma vez que quando o oligonucleotídeo está hibridizado, o acesso às bases guanina pelo AM é diminuído, resultando assim numa menor quantidade deste composto na superfície do biossensor, com consequente queda na corrente monitorada. Sendo assim, pela diferença entre a quantidade de AM detectado, é possível reconhecer o evento de hibridização.

A Figura 32 apresenta a detecção da sonda e sonda/alvo imobilizados sobre o poli(4-ABA)/EG, contendo o AM como agente intercalador.



**Figura 32:** VPDs obtidos para: (—) *ssDNA* e (—) *dsDNA* contendo 20  $\mu\text{L}$  de AM  $5,0 \times 10^{-4}$  M. Eletrólito: Tampão fosfato 0,10 M, pH 7,40. Amplitude: 25 mV; Período do Pulso: 0,20 s; Altura do Pulso: 0,06 s;  $v = 20$  mV/s. Tempo de adsorção<sub>AM</sub> = 5 minutos. Eletrodos modificados com poli(4-ABA) por VC (100 ciclos de varredura).

As mudanças nas correntes de pico para o AM foram obtidas para cada etapa de preparação do sensor. Deste modo, a superfície do sensor foi colocada em contato com solução do AM por 5 minutos, no qual ocorre interação do AM com as bases de guanina na sonda (*ssDNA*) ou intercala entre pares de guanina-citosina na dupla fita (*dsDNA*), após a hibridização. O tempo de 5 minutos foi baseado em estudos reportados na literatura. A superfície após a adsorção é lavada rapidamente por cerca de 6 segundos, para eliminar qualquer excesso de AM. As medidas de VPDs foram realizadas em vez de VC para melhorar a sensibilidade do processo de detecção. Assim os VPDs foram obtidos em solução tampão fosfato livre de AM, a fim de garantir que o sinal medido representasse apenas a superfície do complexo DNA-AM.

A diminuição no acesso as bases guanina para a interação com AM, após a hibridização da sonda de poliGA com o alvo complementar (poliCT) promove um decréscimo nos sinais voltamétricos de redução do AM. Este decréscimo na corrente do AM após a hibridização é mostrado pelo VPD da Figura 32.

A Figura 32 indica a presença de um pico voltamétrico bem definido para a redução do AM adsorvido sobre os eletrodos de grafite modificado com poli(4-ABA), contendo a sonda e o híbrido em aproximadamente -0,26 V.

A intensidade de  $I_{pc}$  é atribuída à interação do AM com os resíduos de guanina da

ssDNA. A magnitude do pico desta forma reflete na extensão da interação do AM com a ssDNA e a dsDNA. Após exposição da interface com o alvo, o qual contém a complementação da sonda, uma diminuição na corrente de redução resultante da adsorção do AM em cerca de 22,5% é obtida. Esta diminuição na corrente reflete em grande diferença na afinidade do AM aos pares de bases da guanina presentes na sonda, causada pela formação do híbrido que diminui o acesso de intercalação às bases guanina. Esta diminuição é atribuída à inibição pelo efeito estérico dos grupos redutíveis do AM intercalados entre a dupla hélice do DNA.

Conclui-se que este procedimento obtido para a eletropolimerização por VC para a obtenção do genossensor, mostrou-se eficiente para a detecção do evento de hibridização e promissor para a incorporação de fragmentos de DNA que sejam específicos.

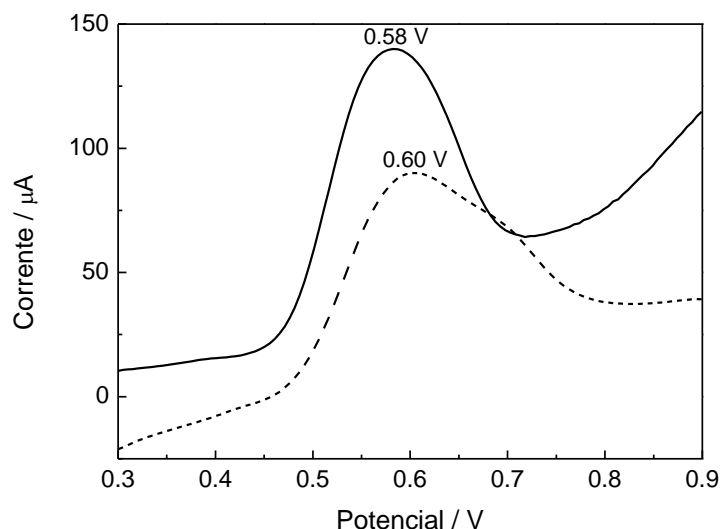
#### **5.7.2. Detecção de oligonucleotídeos utilizando-se brometo de etídio**

Métodos diretos e indiretos são usados para a detecção da imobilização de sonda e alvo sobre uma matriz. Este sinal pode ser detectado por meio de intercaladores como o brometo de etídio (BE).

Mesmo com as grandes promessas do uso de biossensores ópticos, muitos autores têm usado métodos eletroquímicos para estudar as interações de moléculas pequenas como o DNA<sup>72,73</sup>, incluindo o BE<sup>74</sup> devido à praticidade e facilidade do método. O BE apresenta eletroatividade, sendo oxidado em torno de +0,70 V (*versus* eletrodo de calomelano saturado). Esta propriedade, juntamente com a interação das duplas fitas do DNA, torna o sistema potencial para a construção de genossensores, baseados na detecção indireta da hibridização através da oxidação de BE<sup>11</sup>.

A adsorção do brometo de etídio foi previamente investigada sobre os eletrodos EG e Poli(4-ABA)/EG. A Figura 33 mostra o voltamograma de pulso diferencial obtido para os eletrodos EG e Poli(4-ABA)/EG modificado por VC, após 5 minutos em contato com 20 µL de BE  $5,0 \times 10^{-4}$  M.



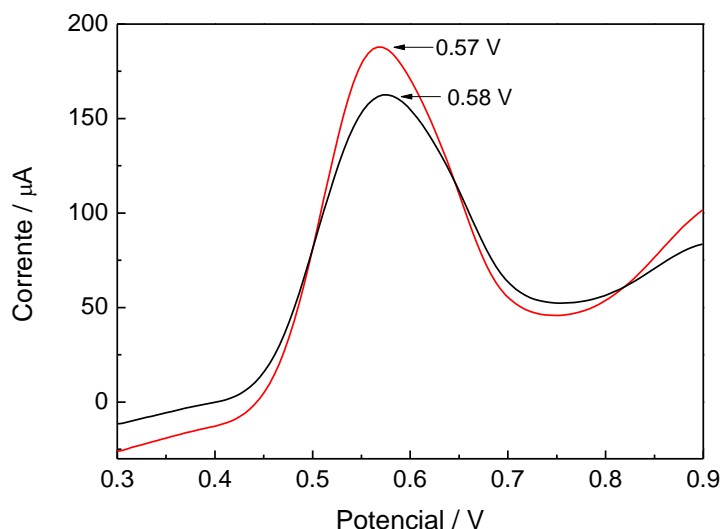


**Figura 33:** VPDs obtidos para: (---) EG e (—) poli(4-ABA)/EG contendo 20  $\mu\text{L}$  de BE  $5,0 \times 10^{-4}$  M. Eletrólito: Tampão fosfato 0,10 M, pH 7,40. Amplitude: 25 mV; Período do Pulso: 0,20 s; Altura do Pulso: 0,06 s;  $v = 20$  mV/s. Tempo de adsorção<sub>BE</sub> = 5 minutos.

Na Figura 33 observa-se um aumento nos valores de  $I_{pa}$  para o poli(4-ABA)/EG, isto sugere que há uma interação entre o brometo de etídio e a plataforma de poli(4-ABA). Esta interação é principalmente eletrostática, devido ao aumento observado nos valores de corrente. A diferença entre esse sistema e do eletrodo de grafite é o fato de que o grafite não possui sítios de ligação para a imobilização de biomoléculas e essas são eliminadas nas etapas de lavagem. Um deslocamento 20 mV também pode ser observado, resultando no deslocamento para potenciais menos catódicos.

A VPD foi utilizada neste trabalho devido ser uma técnica muito sensível. Os parâmetros eletroquímicos da VPD para a detecção do BE sobre os eletrodos de grafite foram otimizados sendo então aplicados ao eletrodo modificado. Considerando-se a seletividade e sensibilidade, a varredura foi realizada de +0,30 a +0,90 V, 20 mV/s, 25 mV de amplitude de pulso e 60 ms de altura do pulso, sendo utilizados para detecção do BE quando em contato com *ssDNA* e *dsDNA*, sobre eletrodos de grafite modificados com poli(4-ABA).

O BE foi imobilizado sobre *ssDNA* e *dsDNA* para se observar a intercalação do mesmo ao sistema *dsDNA*/BE no poli(4-ABA)/EG. A detecção do alvo complementar foi realizada pela medida da corrente de pico anódica do BE. Os VPDs para o *ssDNA* e *dsDNA* após contato com o intercalador são mostrados na Figura 34.



**Figura 34:** VPDs obtidos para: (—) *ssDNA* e (—) *dsDNA* contendo 20  $\mu\text{L}$  de BE  $5,0 \times 10^{-4}$  M. Eletrólito: Tampão fosfato 0,10 M, pH 7,40. Amplitude: 25 mV; Período do Pulso: 0,20 s; Altura do Pulso: 0,06 s;  $v = 20$  mV/s. Tempo de adsorção<sub>BE</sub> = 5 minutos. Eletrodos modificados com poli(4-ABA) por VC.

Na Figura 34, é possível detectar significativamente os eventos de hibridização através da detecção indireta de BE. As diferenças entre os sinais de corrente são devido às diferentes formas com que as biomoléculas interagem com o BE. Na presença apenas da sonda, *ssDNA*, o sinal da corrente de pico anódica é mais baixo do que com o alvo, *dsDNA*. Isso se deve ao efeito intercalante do BE sobre o DNA nativo, ou seja, hibridizado, onde ele pode se acomodar mais facilmente entre os pares de bases da estrutura. Desta forma é possível realizar a detecção.

Ao contrário do AM o BE apresenta uma melhor interação com a dupla fita do DNA. Quando o poliGA (*ssDNA*) foi colocado em contato com 0,126 mM do alvo complementar (poliCT), e o sistema foi incubado por 20 minutos a 42 °C, ocorre a formação do híbrido. Após este período o eletrodo foi lavado em tampão fosfato e seco em  $\text{N}_2$ . Após isso,  $5,0 \times 10^{-4}$  M de BE foi colocado sobre o eletrodo por 5 minutos e também lavado. A corrente de oxidação resultante da adsorção do BE foi cerca de 187  $\mu\text{A}$ , cerca de 16% maior que a do *ssDNA*/Poli(4-ABA)/EG. Isto é considerável porque o valor da  $I_{\text{pa}}$  é derivado das ligações do BE à *dsDNA* na superfície do eletrodo.

Conclui-se que o genossensor possui resposta eletroquímica para o alvo complementar proposto no trabalho. Portanto, tais resultados são promissores no desenvolvimento e aprimoramento destas plataformas funcionalizadas para genossensores, que são uma forte

promessa para um rápido, barato e simples diagnóstico de doenças genéticas.

## **5.8. Aplicação das plataformas de poli(4-ABA) em biossensores microbiológicos**

Um segundo mecanismo de aplicação das plataformas de poli(4-ABA), foi a utilização das mesmas na construção de um biossensor com detecção impedimétrica contendo peptídeos imobilizados. Neste tópico, estão apresentados os resultados do estudo realizado para avaliar o efeito do colesterol na interação do peptídeo DD K com membranas fosfolipídicas.

### **5.8.1 Resposta da espectroscopia de impedância eletroquímica em polímeros condutores**

Vários tipos de biossensores com detecção por medidas de EIE têm sido desenvolvidos e descritos na literatura. Tais sensores são baseados nas mudanças das propriedades elétricas resultantes da interação sonda/alvo sobre a superfície dos eletrodos. Estes sistemas contêm duas unidades funcionais básicas: um receptor e um transdutor. As aplicações destes no monitoramento e controle ambiental, indústria de alimentos, farmacêutica e clínica têm possibilitado análises com monitoramento contínuo e *in vivo* em tempo real<sup>75</sup>.

A EIE tem adquirido grande importância, pois é uma técnica capaz de avaliar processos interfaciais e superficiais, uma vez que estes processos são de fundamental importância no entendimento dos mecanismos de interação entre o sistema de reconhecimento e o analito. Além de possibilitar a obtenção de grande número de informações a partir de um único experimento. As medidas de EIE são realizadas variando-se os valores de altas frequências para baixas frequências, desta forma, a EIE permite a obtenção de informações dos diferentes processos eletroquímicos e suas constantes de tempo.

O conceito de impedância, originalmente introduzido para descrever a resposta de sistemas compostos por capacitâncias, resistências e indutâncias, estendeu-se aos sistemas eletroquímicos, uma vez que inúmeros processos podem contribuir para a relação entre a corrente e o potencial do sistema. Assim, a partir das medidas da impedância e ângulo de fase é possível avaliar processos como transporte de carga, condutividade de filmes, capacitância da dupla camada, entre outros.

Desta forma, a aplicação da EIE tem se estendido à investigação de propriedades condutoras de polímeros, pois a investigação de mecanismos de transferência de carga em filmes modificados com biomoléculas tem sido realizada mediante avaliação do

comportamento da impedância do sistema em função da frequência de excitação. Estas investigações têm o propósito de indicar as relações entre as alterações no polímero e as interações resultantes da bioafinidade entre o receptor e o analito. Assim, a EIE pode gerar informações sobre as propriedades condutoras dos sistemas desenvolvidos<sup>75</sup>.

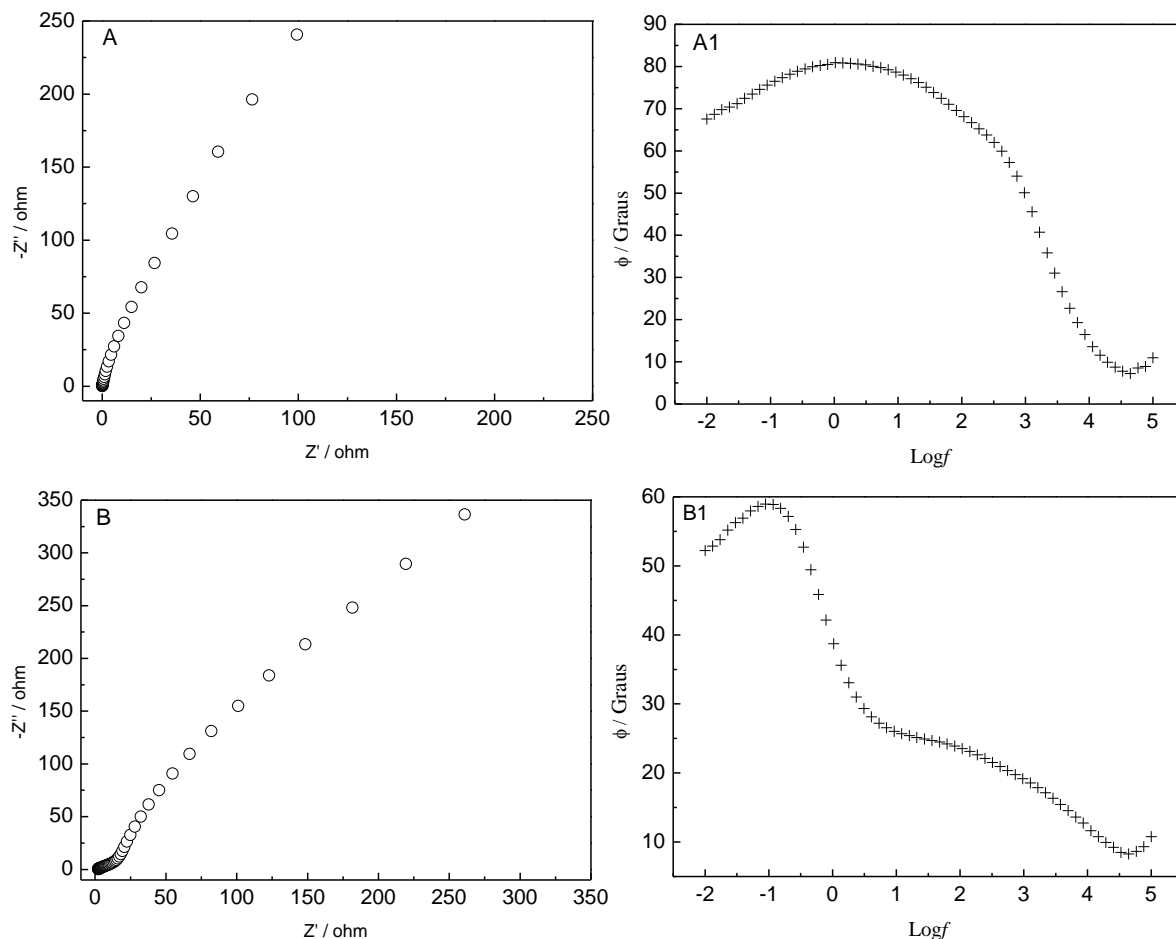
Antes do processo de imobilização e para comparação dos resultados obtidos, realizou-se medidas de EIE dos eletrodos Poli(4-ABA)/EG em solução somente do eletrólito suporte, KCl 1,0 M e na presença da sonda redox, solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio contendo KCl 1,0 M, conforme gráficos apresentadas na Figura 35, que mostra os espectros de impedância eletroquímica, denominados diagramas do plano complexo (Nyquist) e de Bode. As medidas foram obtidas no OCP, sendo este de 0,26 V.

Nos diagramas da Figura 35 pode-se observar a variação de magnitude para os espectros em estudo do filme polimérico na presença da sonda redox e na solução de KCl.

Nas Figuras 35A e 35A1, pode-se verificar a influência do eletrólito suporte na interface polímero/solução, região da dupla camada elétrica (DCE), e na condutividade do polímero, pois na presença do eletrólito suporte, a transferência de carga ocorre somente dentro do polímero, ou seja, a reação ocorre entre o polímero e a solução do eletrólito suporte.

A condutividade intrínseca é produzida a partir da formação de cargas transportadoras através da estrutura conjugada ao longo da cadeia polimérica. A oxidação do polímero provoca o surgimento de estados eletrônicos localizados e os chamados pólarons e bipólarons são formados.

Desta forma, na interface eletrodo/polímero/eletrólito, a transferência de carga acontece de diferentes formas. No eletrodo a condutividade é eletrônica, há a transferência de elétrons na interface eletrodo/polímero. No filme polimérico, a condutividade é eletrônica mista, pois ocorre através dos elétrons e dos pólarons presentes no polímero. Já no eletrólito, a condutividade é iônica na interface polímero/solução, há a entrada de íons da solução para o polímero.



**Figura 35:** Diagramas de Nyquist (o) e Bode (+) dos espectros de impedância eletroquímica do poli(4-ABA)/EG, sendo (A) e (A1) obtidos em solução de KCl 1,0 M e (B), (B1) obtidos em solução de  $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$  5,00 mM contendo KCl 1,0 M.  $E_{pa} = 0,26$  V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência:  $10^6$  a  $10^{-2}$  Hz.

Na Figura 35A, com ausência da sonda redox, observa-se que a condutividade dentro do polímero é influenciada pelos íons  $[Cl^-]$ , o eletrodo é bloqueado, com formação de uma barreira reflectiva, pois neste caso, o polímero condutor está em eletrólito suporte puro, há esgotamento (“saturação”) das espécies eletroativas, ou seja, há o bloqueio completo da difusão na interface polímero/solução.

Nas Figuras 35B e 35B1, observa-se que na presença da sonda redox, os espectros de impedância mudam-se em relação aos espectros somente no eletrólito suporte, há a formação de uma barreira transmissiva, onde existe transferência de carga na interface polímero/solução. Verifica-se ainda na Figura 35B1 a ocorrência de uma constante de tempo adicional, característica da formação de uma nova interface ou propriedades eletrônicas muito diferenciadas.

### **5.8.2 Avaliação do poli(4-ABA) na imobilização e detecção impedimétrica do peptídeo *dermadistinctina K* (DD K)**

O peptídeo DD K foi imobilizado sobre a superfície do eletrodo modificado com poli(4-ABA), estudou-se a sua interação com o fosfolípídeo 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC) e, posteriormente, investigou-se o efeito do colesterol na interação do peptídeo DD K com lipossomas de POPC, ou seja, o seu efeito na ligação de DD K com vesículas unilamelares grandes (LUVs de 100 nm).

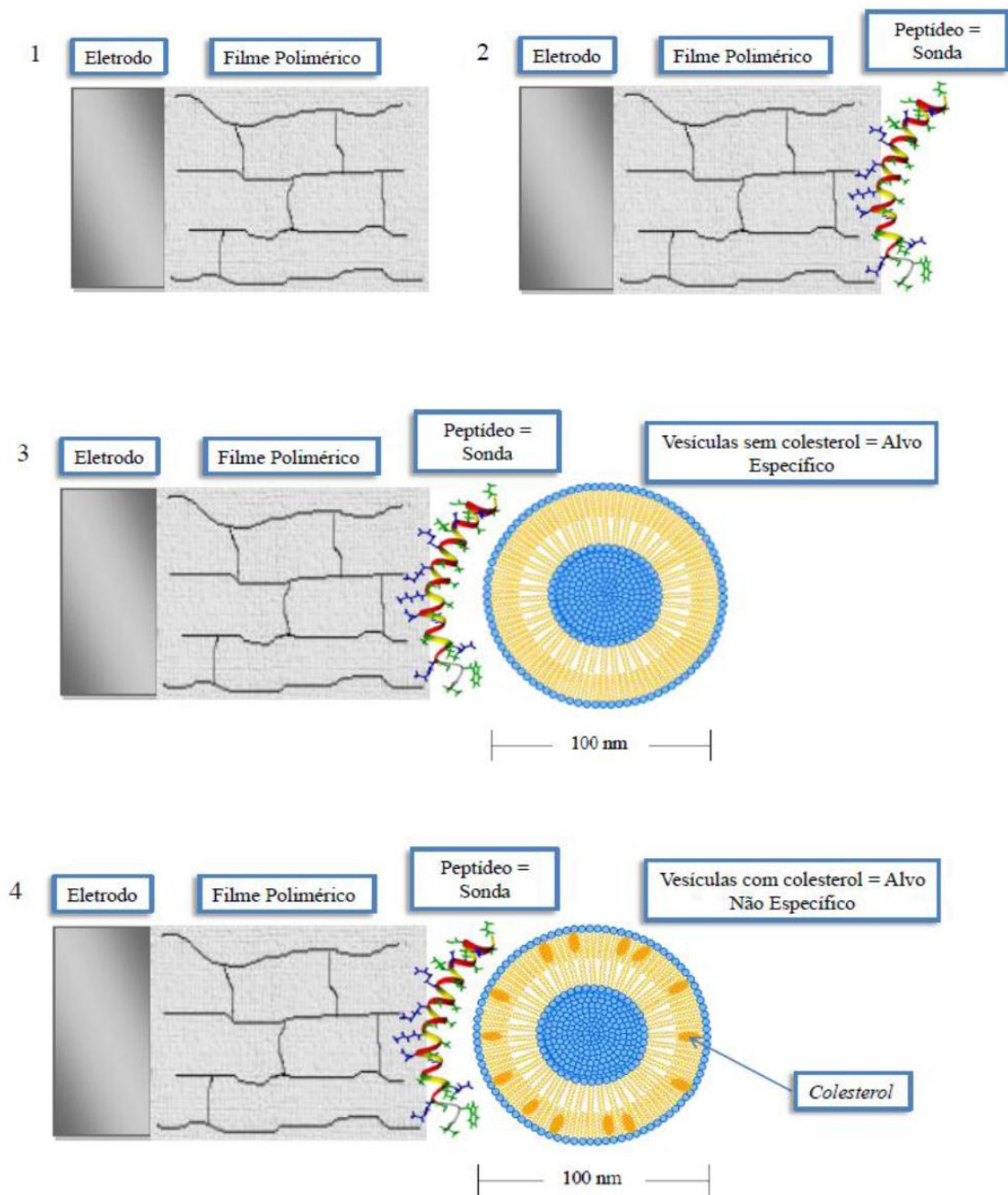
Para isto foram preparadas LUVs sem colesterol e LUVs com colesterol, sendo 43% em mol de colesterol a concentração empregada na composição das LUVs, de forma a aproximar-se da razão molar colesterol/fosfolípídeos típica de células de eritrócitos (0,84)<sup>76</sup>. A Figura 36 mostra a representação esquemática deste processo.

A detecção dos sistemas investigados descritos anteriormente foi realizada por EIE. Tal técnica foi escolhida devido a todas as suas características citadas anteriormente, bem como por não se apresentar como uma análise destrutiva, mas que também fornece informações bastante relevantes e sensíveis das propriedades elétricas contidas na interface eletrodo/solução.

Na Figura 37, pode-se observar os espectros de impedância eletroquímica, conhecidos como diagramas do plano complexo (Nyquist) e de Bode, resultantes da imobilização do peptídeo, conforme ilustrado na Figura 36.

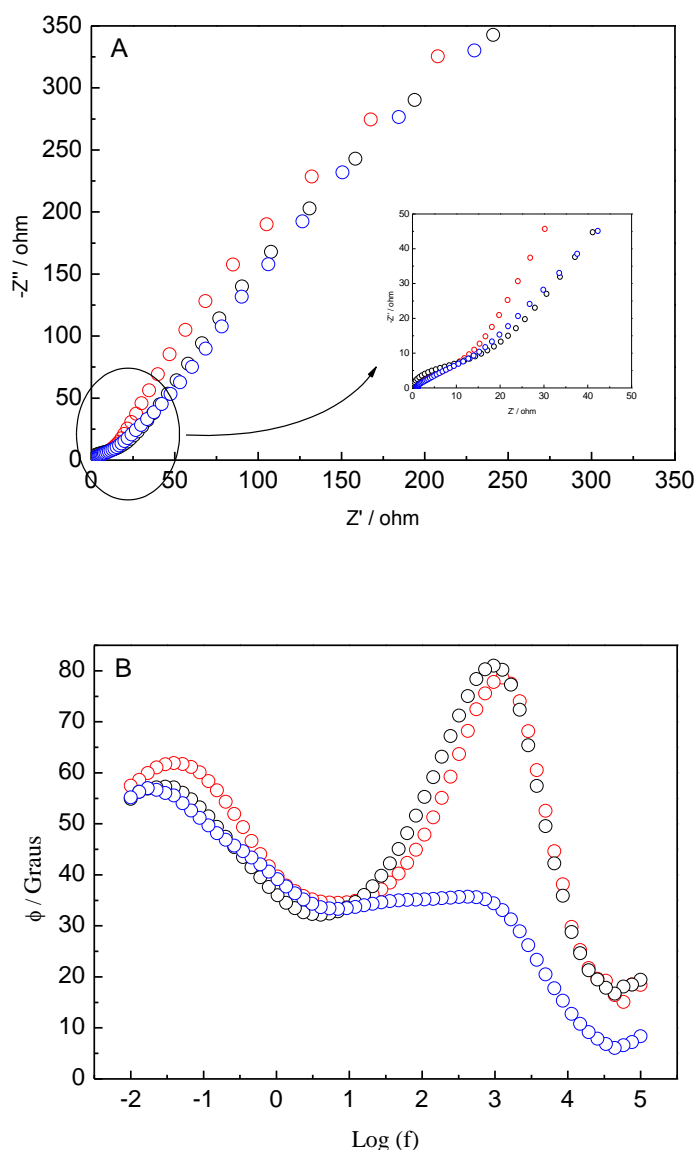
Foi imobilizado nos eletrodos contendo o poli(4-ABA) o peptídeo DD K e o reconhecimento biológico foi feito com o alvo complementar e não complementar. Em outras palavras, a sonda, peptídeo DD K, o alvo específico (fosfolípídeo POPC), e o alvo não específico (fosfolípídeo POPC + colesterol).

Todas as medidas foram obtidas no OCP, potencial este registrado em +0,26 V, em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio contendo KCl 1,0 M, numa frequência de 100 kHz a 10 mHz e amplitude de 10 mV. Em solução da sonda redox, nesta região de potencial de +0,26 V, a corrente é faradáica com contribuições do par redox  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , conforme já previamente discutido no item 5.2.2.



**Figura 36:** Representação esquemática do processo de imobilização para os eletrodos modificados com poli(4-ABA). Sendo (1) poli(4-ABA)/EG, (2) poli(4-ABA)/EG + Sonda, (3) poli(4-ABA)/EG + Sonda + Alvo Específico e (4) poli(4-ABA)/EG + Sonda + Alvo Não Específico.

Conforme observado na Figura 37B, para os três sistemas investigados é evidente o aparecimento de dois semicírculos, um em regiões de altas frequências e outro em regiões de baixa frequência. Verifica-se que a presença do peptídeo (Figura 37A) imobilizado sobre o polímero, não ocasiona em grandes variações no perfil do espectro de EIE quando comparado ao espectro do poli(4-ABA) mostrado na Figura 35B.



**Figura 37:** Diagramas de Nyquist (A) e Bode (B) dos espectros de impedância eletroquímica do Poli(4-ABA)/EG, obtidos em solução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5,00 mM contendo KCl 1,0 M. Sendo: (o) sonda, (o) sonda + alvo específico e (o) sonda + alvo não específico.  $E_{\text{pa}} = +0,26$  V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência:  $10^6$  a  $10^{-2}$  Hz.

Portanto, pode-se inferir que há uma forte interação na interface polímero/peptídeo, de modo que não se observa a ocorrência de uma constante de tempo adicional, característica da formação de uma nova interface ou propriedades eletrônicas muito diferenciadas.

O peptídeo DD K foi depositado na superfície do eletrodo por adsorção, pois a plataforma funcionalizada com o filme polimérico, o poli(4-ABA), apresenta um caráter aniônico, o que permite a sua ligação com a face hidrofílica do peptídeo, a qual possui cargas positivas. Atualmente, vários modelos indicam que o mecanismo de ação de peptídeos



antimicrobianos ocorre pela combinação de efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos. Portanto, o peptídeo mantém as regiões hidrofóbicas ligadas à região apolar da membrana enquanto as regiões hidrofílicas ficam expostas para facilitar o fluxo livre de íons e moléculas pequenas através da bicamada lipídica. Estes peptídeos carregados positivamente são atraídos pela superfície aniônica das membranas fosfolipídicas.

O DD K é um peptídeo anfipático, sendo assim, a anfipaticidade é uma característica fundamental para a interação do peptídeo com membranas fosfolipídicas. Portanto, essa estrutura anfipática do peptídeo favorece a interação com as LUVs, e essa forte interação faz com que ocorra uma fragmentação dessas membranas<sup>77</sup>, de forma que os lipossomas permanecem no meio, mas não mais como uma vesícula, e sim de forma desorganizada.

Desta forma, pode-se observar que há uma semelhança entre os diagramas de Bode para as medidas da sonda e da sonda + alvo específico (Figura 37B), pois a interação que ocorre na interface peptídeo/LUVs é tão forte que destrói as LUVs, por isso não há alteração nos resultados para essas medidas. Já no caso do eletrodo contendo a sonda + alvo não específico (LUVs com colesterol), o diagrama apresenta um perfil diferenciado, pois o resultado é totalmente alterado em relação à sonda. Neste caso, há uma interação na interface peptídeo/LUVs com colesterol, porém, essa interação é fraca, de forma que não causa a destruição das LUVs, devido à presença do colesterol nas LUVs, que diminui a interação na interface.

Isso pode ser comprovado por estudos realizados por ITC, citados na literatura, que descrevem a interação do peptídeo DD K com as vesículas unilamelares (LUVs) sem colesterol. Estes estudos mostraram que o peptídeo DD K é capaz de incorporar-se em LUVs sem colesterol, levando a um aumento significativo do tamanho da vesícula, porém não em LUVs com alta concentração de colesterol, ou seja, a ligação de DD K com vesículas unilamelares é significativamente afetada pelo colesterol<sup>77</sup>. Tais dados contribuem para explicar a baixa atividade hemolítica do peptídeo, que em grande parte, se deve à presença do colesterol em células eucariotas. Já em células bacterianas, ausentes de colesterol, a atividade hemolítica do peptídeo DD K é alta, desta forma, ele apresenta atividade antibacteriana significativa.

Verly e colaboradores<sup>77</sup> realizaram estudos termodinâmicos da interação do peptídeo com membranas fosfolipídicas utilizando a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), uma das técnicas mais empregadas para descrição termodinâmica de diferentes sistemas biomoleculares. Ela permite o estudo em ambientes muito similares ao de membranas biológicas, como vesículas de bicamadas fosfolipídicas, possibilitando uma

completa descrição termodinâmica do sistema com a obtenção de parâmetros termodinâmicos como  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ , que podem resultar em informações como constantes de interação ( $K$ ) ou, até mesmo, fornecer evidências sobre o mecanismo de interação do sistema em estudo<sup>59</sup>. O efeito do colesterol nas interações entre DD K e LUVs foi analisado por ITC, o qual mostrou que o colesterol reduz a constante de interação do DD K com as LUVs, pois sem a presença do colesterol, foi encontrado um valor muito alto para a constante de interação, indicando uma interação significativa entre as espécies no sistema. Os dados de ITC ainda mostraram que ambos componentes entálpico e entrópico favorecem a ligação peptídeo-LUVs sem colesterol. Finalmente, o valor negativo da variação de energia livre de Gibbs mostra um processo espontâneo na ligação de DD K com LUVs sem colesterol. Dados de RMN<sup>64</sup> em micelas de dodecilsfosfolina (DPC) mostraram que DD K apresenta uma hélice anfipática do resíduo Lys-7 até a extremidade C-terminal, com o resíduo de triptofano direcionado para a região hidrofóbica das micelas. Esses arranjos estruturais colaboram para explicar a alta contribuição do componente entrópico encontrado na interação do DD K com as LUVs. Isto porque a anfipaticidade do DD K favorece a interação com a bicamada e, consequentemente, a dessolvatação da face hidrofóbica, permitindo sua inserção na bicamada, e uma razão importante para uma contribuição entrópica elevada, resultante da desorganização das LUVs devido à interação com o peptídeo.

Através das medidas de EIE utilizando-se o par redox ferro/ferricianeto de potássio como sonda de detecção, demonstrou-se que a plataforma eletroquímica funcionalizada com o poli(4-ABA), apresentou-se eficaz na imobilização bem como na sensibilidade de detecção da interação da sonda com o alvo específico. Foi possível comprovar que a interação do peptídeo DD K com as membranas miméticas de 1-palmitol-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC) é afetada pela presença de colesterol. Assim, os estudos de construção do biossensor com detecção impedimétrica mostraram resultados satisfatórios, a EIE, podendo ser, portanto, uma ferramenta utilizada com sucesso para a investigação do processo de interação do peptídeo DD K com lipossomas. Além disso, não foi reportado na literatura estudos da interação e detecção de peptídeos com membranas fosfolipídicas, utilizando-se plataformas eletroquímicas bem como plataformas funcionalizadas com filmes poliméricos.

A especificidade do biossensor impedimétrico foi avaliada, através da variação da força iônica do meio. Assim, a diminuição e o aumento na concentração (KCl 0,10 M) do eletrólito suporte em cerca de 10x mostraram resultados completamente diferentes para os sistemas investigados. Os espectros de impedância eletroquímica, obtidos nas mesmas condições que os das Figuras 35 e 37, alterando somente a concentração do eletrólito suporte,

KCl para 0,01 M e para 1,0 M estão em fase de estudo e são apenas resultados preliminares.

Como propostas futuras têm-se a utilização de outras técnicas para análise de caracterização sobre a estrutura do material estudado. Além disso, promover a otimização dos parâmetros do biossensor impedimétrico proposto no sentido de garantir melhor desempenho do mesmo nas medidas de reconhecimento biológico.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A proposta deste trabalho foi contribuir na área do desenvolvimento de sensores eletroquímicos, pela investigação da utilização de plataformas eletroquímicas funcionalizadas com filmes poliméricos aplicadas a biossensores.

Foram desenvolvidos eletrodos modificados com filmes poliméricos derivados do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), com posterior aplicação na imobilização de biomoléculas para a produção de biossensores eletroquímicos, visando contribuir para o desenvolvimento de sensores biológicos que possam ser utilizados na detecção em tempo real de amostras que possam ser de interesse clínico, biológico e/ou ambiental.

Realizou-se a eletropolimerização do ácido 4-aminobenzóico sobre eletrodos de grafite, utilizando-se as técnicas de VC e CA. A eletropolimerização foi realizada em meio de ácido perclórico, onde foi possível observar a deposição do poli(4-ABA), sendo que este material apresentou atividade eletroquímica, caracterizada pela presença de dois pares redox eletroativos.

Verificou-se que a VC apresentou melhores resultados e se mostrou mais eficiente em todas as análises realizadas comparada com a CA. Comparou-se também o tempo de eletropolimerização para a CA e concluiu-se que o perfil eletroquímico obtido foi semelhante para os filmes eletropolimerizados no tempo de 4800 segundos e 2400 segundos. Maiores quantidades de filme polimérico foram obtidas no potencial constante de 1,05 V, o que foi comprovado pelos resultados de MEV e EIE, pois através das medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica verificou-se uma maior resistência à transferência de carga para o eletrodo modificado no potencial 1,05 V, seguido do eletrodo modificado por VC.

Além de uma semelhança entre os perfis eletroquímicos, concluiu-se que os filmes eletropolimerizados por CA no potencial constante de 1,05 V são mais promissores para a imobilização das bases púricas adenina e guanina, precursoras na detecção de genossensores, pois estes apresentaram uma melhor resposta na imobilização destas bases nitrogenadas. Assim, o eletrodo de grafite modificado com poli(4-ABA) se mostrou uma eficiente plataforma para a imobilização e detecção das bases nitrogenadas.

Por meio dos estudos realizados com a eletropolimerização do 4-ABA sobre eletrodos de grafite, bem como da incorporação de biomoléculas sobre a matriz de poli(4-ABA), pode-se concluir que a plataforma poli(4-ABA)/EG se mostrou bastante promissora para o desenvolvimento de genossensores.

Desta forma, o eletrodo de grafite modificado com poli(4-ABA) foi eficiente para a

imobilização do oligonucleotídeo (poliGA), bem como a detecção de hibridização com o oligonucleotídeo complementar (poliCT). Quando os intercaladores azul de metileno e brometo de etídio foram utilizados, estes apresentaram resultados satisfatórios para o reconhecimento dos processos de hibridização. A *ssDNA* apresentou melhor afinidade pelo AM enquanto que a resposta eletroquímica do BE foi melhor observada na *dsDNA*.

Foi possível observar melhorias significativas para os eletrodos modificados, tanto na imobilização como na detecção dos oligonucleotídeos, em relação aos eletrodos não modificados. O reconhecimento da hibridização pode ser avaliado pelas duas metodologias propostas (detecção indireta do AM e BE). Tais resultados são promissores no desenvolvimento e aprimoramento destas plataformas funcionalizadas para genossensores.

Foram avaliados estudos pela imobilização do peptídeo DD K, com o alvo específico (fosfolípídeo POPC), e o alvo não específico (fosfolípídeo POPC + colesterol). Para os três sistemas investigados foi evidente o aparecimento de dois semicírculos, um em regiões de altas frequências e outro em regiões de baixa frequência. A imobilização do peptídeo não gerou grandes alterações no perfil dos espectros de EIE, quando comparados aos espectros somente da plataforma funcionalizada, o que leva a indicação que houve uma forte interação na interface polímero/peptídeo. Foi possível observar uma semelhança entre os diagramas de Bode para as medidas da sonda e da sonda + alvo específico, devido à forte interação existente entre peptídeo/LUVs sem colesterol, que destrói as LUVs. Contudo, para o eletrodo contendo a sonda + alvo não específico (LUVs com colesterol), o diagrama de Bode apresentou um perfil diferenciado, pois o resultado é totalmente alterado em relação à sonda.

Como perspectiva tem-se o estudo da imobilização de fragmentos de DNA contendo 32 e/ou 64 pares de bases, com posterior detecção com o respectivo alvo complementar, para a construção de sensores biológicos, bem como a utilização de agentes intercaladores (AM e BE) para o reconhecimento do evento de hibridização, bem como investigar outros peptídeos e agentes de reconhecimento, além da otimização dos procedimentos de imobilização e detecção. De modo geral, muito estudo ainda pode ser realizado para otimizar os parâmetros dos biossensores propostos, garantindo-se assim melhor desempenho dos mesmos nas medidas de reconhecimento biológico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marinho, M. I. C.; ***Desenvolvimento de eletrodo modificado com polímero de azul de metileno para a determinação eletroanalítica de glifosato***. Dissertação de Mestrado, **2010**, Instituto de Química, USP, São Carlos.
2. Pereira, F. C.; Bergamo, E. P.; Zanoni, M. V. B.; Moretto, L. M. and Ugo, P.; ***Aplicações de nanoeletrodos como sensores na Química Analítica***. *Química Nova*, 29:(5), **2006**, 1054-1060.
3. Soares, J. C.; ***Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol***. Dissertação de Mestrado, **2011**, Instituto de Física e Química de São Carlos, USP, São Carlos.
4. Thevenot, D. R.; Tóth, K.; Durst, R. A. and Wilson, G. S.; ***Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification***. In *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 71 2333 (1999).
5. Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A. and Wilson, G. S.; ***Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification***. *Biosensors and Bioelectronics*, 16:(1-2), **2001**, 121-131.
6. Salgado, A. M.; ***Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo***. Tese de Doutorado, **2001**, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
7. Oliveira, I. R. W. Z.; ***Desenvolvimento de biossensores e sensores biomimétricos para determinação de compostos fenólicos***. Tese de Doutorado, **2007**, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis.
8. Clark, L. C. and Lyons, C.; ***Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery***. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102:(1), **1962**, 29-45.
9. Wang, J.; ***Electrochemical Glucose Biosensors***. *Chemical Reviews*, 108:(2), **2007**, 814-825.
10. Newman, J. D. and Turner, A. P. F.; ***Home blood glucose biosensors: a commercial perspective***. *Biosensors and Bioelectronics*, 20:(12), **2005**, 2435-2453.

11. Franco, D. L.; ***Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, utilizando matriz polimérica modificada com biomoléculas, para o diagnóstico de câncer de próstata e hepatite C. Tese de Doutorado***, 2010, Instituto de Química, UFU, Uberlândia.
12. Lei, Y.; Chen, W. and Mulchandani, A.; ***Microbial biosensors. Analytica Chimica Acta***, 568:(1-2), 2006, 200-210.
13. Adhikari, B. and Majumdar, S.; ***Polymers in sensor applications. Progress in Polymer Science***, 29:(7), 2004, 699-766.
14. D'Orazio, P.; ***Biosensors in clinical chemistry. Clinica Chimica Acta***, 334:(1-2), 2003, 41-69.
15. Mello, L. D. and Kubota, L. T.; ***Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. Food Chemistry***, 77:(2), 2002, 237-256.
16. Luong, J. H. T.; Male, K. B. and Glennon, J. D.; ***Biosensor technology: Technology push versus market pull. Biotechnology Advances***, 26:(5), 2008, 492-500.
17. Andrade, V. M.; ***Confecção de biossensores através da imobilização de biocomponentes por eletropolimerização de pirrol. Dissertação de Mestrado***, 2006, Escola de Engenharia, UFRGS, Porto Alegre.
18. Barsan, M. M. and Brett, C. M. A.; ***A new modified conducting carbon composite electrode as sensor for ascorbate and biosensor for glucose. Bioelectrochemistry***, 76:(1-2), 2009, 135-140.
19. Conroy, P. J.; Hearty, S.; Leonard, P. and O'Kennedy, R. J.; ***Antibody production, design and use for biosensor-based applications. Seminars in Cell & Developmental Biology***, 20:(1), 2009, 10-26.
20. Issa, R.; Hamdan, N. A. and Noh, M. F. M.; ***Differential Pulse Voltammetric determination of DNA hybridization using Methylene Blue on screen printed carbon electrode for the detection of Mycobacterium tuberculosis. Biotechnology***, 9:(3), 2010, 304-311.
21. Wang, J.; ***Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, 19:(1-2), 1999, 47-53.

22. Ting, B. P.; Zhang, J.; Gao, Z. and Ying, J. Y.; ***A DNA biosensor based on the detection of doxorubicin-conjugated Ag nanoparticle labels using solid-state voltammetry.*** *Biosensors and Bioelectronics*, 25:(2), **2009**, 282-287.
23. Sethi, R. S.; ***Transducer aspects of biosensors.*** *Biosensors and Bioelectronics*, 9:(3), **1994**, 243-264.
24. Karyakin, A. A.; Vuki, M.; Lukachova, L. V., *et al.*; ***Processible polyaniline as an advanced potentiometric pH transducer. Application to biosensors.*** *Analytical Chemistry*, 71:(13), **1999**, 2534-2540.
25. Patacas, R. C.; ***Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas.*** *Dissertação de Mestrado*, **2007**, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto.
26. Singh, M.; Verma, N.; Garg, A. K. and Redhu, N.; ***Urea biosensors.*** *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134:(1), **2008**, 345-351.
27. Fatibello-Filho, O. and Capelato, M. D.; ***Biossensores.*** *Química Nova*, 15:(1), **1992**, 28 -39.
28. Silva, J. J. B.; ***Desenvolvimento de biossensores eletroquímico e piezelétrico de DNA para diagnósticos clínicos.*** *Tese de Doutorado*, **2004**, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife.
29. Vieira, S. N.; ***Desenvolvimento e caracterização de um novo material polimérico para aplicação em biossensores eletroquímicos na detecção de compostos fenólicos.*** *Tese de Doutorado*, **2011**, Instituto de Química, UFU, Uberlândia.
30. Gil, E. D. S.; Kubota, L. T. and Yamamoto, Y. I.; ***Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica.*** *Química Nova*, 22:(1999), 874-881.
31. Silva Nunes, G.; Jeanty, G. and Marty, J.-L.; ***Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides: Comparative study.*** *Analytica Chimica Acta*, 523:(1), **2004**, 107-115.
32. Gomes, M. F.; ***Caracterização estrutural do poli(ácido 4 hidroxifenilacético) eletropolimerizado sobre eletrodo de grafite e sua aplicação no desenvolvimento de imunossensor amperométrico para diagnóstico de Leishmaniose Visceral.***



*Dissertação de Mestrado*, **2011**, Instituto de Química, UFU, Uberlândia.

33. Shirakawa, H.; Louis, E. J., MacDiarmid, A. G.; Chiang, C. K. and Heeger, A. J.; ***Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)***. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 16), **1977**, 578-580.
34. Atta, N. F.; Marawi, I.; Petticrew, K. L., *et al.*; ***Electrochemistry and detection of some organic and biological molecules at conducting polymer electrodes. Part 3. Evidence of the electrocatalytic effect of the heteroatom of the poly(heteroarylene) at the electrode/electrolyte interface***. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 408:(1–2), **1996**, 47-52.
35. Pereira, E. M. C. C.; ***Caracterização de filmes de poli[Ni(saltMe)] por Espectroscopia de Impedância Electroquímica***. *Dissertação de Mestrado*, **2003**, Faculdade de Ciências, FCUP, Porto.
36. Guimard, N. K.; Gomez, N. and Schmidt, C. E.; ***Conducting polymers in biomedical engineering***. *Progress in Polymer Science*, 32:(8–9), **2007**, 876-921.
37. Hansen, B.; ***Metodologia para produção de biossensores amperométricos enzimáticos utilizando polímeros condutores: caso polianilina***. *Dissertação de Mestrado*, **2011**, Escola de Engenharia, UFRGS, Porto Alegre.
38. Gerard, M.; Chaubey, A. and Malhotra, B. D.; ***Application of conducting polymers to biosensors***. *Biosensors and Bioelectronics*, 17:(5), **2002**, 345-359.
39. Malhotra, B. D.; Chaubey, A. and Singh, S. P.; ***Prospects of conducting polymers in biosensors***. *Analytica Chimica Acta*, 578:(1), **2006**, 59-74.
40. Sadki, S.; Schottland, P.; Brodie, N. and Sabouraud, G.; ***The mechanisms of pyrrole electropolymerization***. *Chemical Society Reviews*, 29:(5), **2000**, 283-293.
41. Schuhmann, W.; Kranz, C.; Wohlschläger, H. and Strohmeier, J.; ***Pulse technique for the electrochemical deposition of polymer films on electrode surfaces***. *Biosensors and Bioelectronics*, 12:(12), **1997**, 1157-1167.
42. Xu, F.; Gao, M.; Wang, L., *et al.*; ***Sensitive determination of dopamine on poly(aminobenzoic acid) modified electrode and the application toward an experimental Parkinsonian animal model***. *Talanta*, 55:(2), **2001**, 329-336.

43. Huang, K.-J.; Xu, C.-X.; Xie, W.-Z. and Wang, W.; ***Electrochemical behavior and voltammetric determination of tryptophan based on 4-aminobenzoic acid polymer film modified glassy carbon electrode***. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74:(1), **2009**, 167-171.
44. Liu, Y. T.; Deng, J.; Xiao, X. L., *et al.*; ***Electrochemical sensor based on a poly(para-aminobenzoic acid) film modified glassy carbon electrode for the determination of melamine in milk***. *Electrochimica Acta*, 56:(12), **2011**, 4595-4602.
45. Jin, G.-Y.; Li, H. and Xu, W.-B.; ***Sensitive determination of buformin using poly-aminobenzoic acid modified glassy carbon electrode***. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2:(6), **2012**, 458-461.
46. Kotkar, R. M. and Srivastava, A. K.; ***Voltammetric determination of para-aminobenzoic acid using carbon paste electrode modified with macrocyclic compounds***. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 119:(2), **2006**, 524-530.
47. Silva, R. A. M. and Pezza, L.; ***Desenvolvimento de método analítico para determinação de ácido p-aminobenzóico em formulações farmacêuticas via análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica***. Disponível em [http://prope.unesp.br/xxi\\_cic/27\\_32574006836.pdf](http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_32574006836.pdf), **2013**, Acesso em 05 de Novembro de 2013.
48. Zhang, Y.; Wang, J. and Xu, M.; ***A sensitive DNA biosensor fabricated with gold nanoparticles/poly (p-aminobenzoic acid)/carbon nanotubes modified electrode***. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75:(1), **2010**, 179-185.
49. Wang, J.; ***Electrochemical nucleic acid biosensors***. *Analytica Chimica Acta*, 469:(1), **2002**, 63-71.
50. Liu, S.; Ye, J.; He, P. and Fang, Y.; ***Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode***. *Analytica Chimica Acta*, 335:(3), **1996**, 239-243.
51. Zhu, N.; Zhang, A.; Wang, Q.; He, P. and Fang, Y.; ***Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes***. *Analytica Chimica Acta*, 510:(2), **2004**, 163-168.
52. Erdem, A.; Kerman, K.; Meric, B.; Akarca, U. S. and Ozsoz, M.; ***Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus***. *Analytica Chimica Acta*, 422:(2), **2000**, 139-149.

53. Yang, W.; Ozsoz, M.; Hibbert, D. B. and Gooding, J. J.; ***Evidence for the Direct Interaction Between Methylene Blue and Guanine Bases Using DNA-Modified Carbon Paste Electrodes.*** *Electroanalysis*, 14:(18), **2002**, 1299-1302.
54. Liu, J.; Li, J. and Dong, S.; ***Interaction of brilliant cresyl blue and methylene green with DNA studied by spectrophotometric and voltammetric methods.*** *Electroanalysis*, 8:(8-9), **1996**, 803-807.
55. Marrazza, G.; Tombelli, S.; Mascini, M. and Manzoni, A.; ***Detection of human apolipoprotein E genotypes by DNA biosensors coupled with PCR.*** *Clinica Chimica Acta*, 307:(1-2), **2001**, 241-248.
56. Blohm, D. H. and Guiseppi-Elie, A.; ***New developments in microarray technology.*** *Current Opinion in Biotechnology*, 12:(1), **2001**, 41-47.
57. Wang, J.; ***DNA biosensors based on Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. A review.*** *Biosensors and Bioelectronics*, 13:(7-8), **1998**, 757-762.
58. Watson, J. D.; Baker, T. A.; Bell, S. P., *et al.*; ***Biologia Molecular do Gene***, (Porto Alegre: Artmed Editora, 2006).
59. Verly, R. M.; ***Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos.*** *Tese de Doutorado*, **2010**, Instituto de Ciências Exatas, UFMG, Belo Horizonte.
60. Bechinger, B.; ***Structure and Function of Membrane-Lytic Peptides.*** *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23:(3), **2004**, 271-292.
61. Batista, C. V. F.; Rosendo da Silva, L.; Sebben, A., *et al.*; ***Antimicrobial peptides from the Brazilian frog Phyllomedusa distincta1.*** *Peptides*, 20:(6), **1999**, 679-686.
62. Batista, C. V. F., Scaloni, A., Rigden, D. J., *et al.*; ***A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog Phyllomedusa distincta.*** *FEBS Letters*, 494:(1-2), **2001**, 85-89.
63. Brand, G. D.; Leite, J. R. S. A.; Silva, L. P., *et al.*; ***Dermaseptins from Phyllomedusa oreades and Phyllomedusa distincta : ANTI-TRYPANOSOMA CRUZI ACTIVITY WITHOUT CYTOTOXICITY TO MAMMALIAN CELLS.*** *Journal of Biological Chemistry*, 277:(51), **2002**, 49332-49340.

64. Verly, R. M.; Moraes, C. M. D.; Resende, J. M., *et al.*; ***Structure and Membrane Interactions of the Antibiotic Peptide Dermadistinctin K by Multidimensional Solution and Oriented <sup>15</sup>N and <sup>31</sup>P Solid-State NMR Spectroscopy***. *Biophysical Journal*, 96:(6), **2009**, 2194-2203.
65. Csordás, A. and Michl, H.; ***Primary structure of two oligopeptides of the toxin of Bombina variegata L.*** *Toxicon*, 7:(2), **1969**, 103-108.
66. Chan, W. C. and White, P. D.; ***Fmoc solid phase peptide synthesis***, (Oxford University Press, New York, 2000).
67. Bard, A. J. and Faulkner, L. R.; ***Electrochemical Methods, Fundamentals e Applications***, (New York: John Wiley & Sons, 1980).
68. Sur, U. K.; Subramanian, R. and Lakshminarayanan, V.; ***Cyclic voltammetric and electrochemical impedance studies on the structure, adsorption kinetics, and barrier properties of some organic dithiol self-assembled monolayers on gold***. *Journal of Colloid and Interface Science*, 266:(1), **2003**, 175-182.
69. Yang, L.; Li, Y. and Erf, G.F.; ***Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of Escherichia coli O157:H7***. *Analytical Chemistry*, 76:(4), **2004**, 1107-1113.
70. Brett, A. M. O. and Brett, C. M. A. ***Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações***, (Oxford University Press, 1993).
71. Peng, H.; Soeller, C.; Cannell, M. B., *et al.*; ***Electrochemical detection of DNA hybridization amplified by nanoparticles***. *Biosensors and Bioelectronics*, 21:(9), **2006**, 1727-1736.
72. Piedade, J. A. P.; Fernandes, I. R. and Oliveira-Brett, A. M.; ***Electrochemical sensing of DNA–adriamycin interactions***. *Bioelectrochemistry*, 56:(1–2), **2002**, 81-83.
73. Ibrahim, M. S.; ***Voltammetric studies of the interaction of nogalamycin antitumor drug with DNA***. *Analytica Chimica Acta*, 443:(1), **2001**, 63-72.
74. Qi, H.; Li, X.; Chen, P. and Zhang, C.; ***Electrochemical detection of DNA hybridization based on polypyrrole/ss-DNA/multi-wall carbon nanotubes paste electrode***. *Talanta*, 72:(3), **2007**, 1030-1035.

75. Damos, F. S.; Mendes, R. K. and Kubota, L. T.; *Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores*. *Química Nova*, 27:(2004), 970-979.
76. Herrero, A.; Gomez, R.; Snedecor, B.; Tolman, C. and Roberts, M.; *Growth inhibition of Clostridium thermocellum by carboxylic acids: A mechanism based on uncoupling by weak acids*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 22:(1), 1985, 53-62.
77. Verly, R. M.; Rodrigues, M. A.; Daghasanli, K. R. P., *et al.*; *Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes*. *Peptides*, 29:(1), 2008, 15-24.
78. Quintino, M. S. M.; *Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a Batch Injection Analysis (BIA) para aplicações analíticas*. *Tese de Doutorado*, 2003, Instituto de Química, USP, São Paulo.
79. Pereira, A. C.; Santos, A. D. S. and Kubota, L. T.; *Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas*. *Química Nova*, 25:(2002, 1012-1021.
80. Freire, R. S.; Tanaka, A. A.; Sotomayor, M. D. P. T. and Kubota, L. T.; *Amperometric sensors based on biomimetic catalysts*. Vol. 1 (ed. (Org.), C.A.G.E.C.D.M.V.P.) 195-210 (Encyclopedia of Sensors. Stevenson Ranch, California: American Scientific Publishers, 2006).
81. Ram, M. K.; Bertoncello, P.; Ding, H.; Paddeu, S. and Nicolini, C.; *Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique*. *Biosensors and Bioelectronics*, 16:(9-12), 2001, 849-856.
82. Rios, C.; Salvadó, V. and Hidalgo, M.; *Facilitated transport and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA through a solid supported liquid-membrane*. *Journal of Membrane Science*, 203:(1-2), 2002, 201-208.
83. Skoog, D. A.; Holler, F. J. and Nieman, T. A. *Principles of instrumental analysis*, (Philadelphia: Saunders College Publishing, 1998).
84. Karyakin, A. A.; Karyakina, E. E. and Schmidt, H.-L.; *Electropolymerized Azines: A New Group of Electroactive Polymers*. *Electroanalysis*, 11:(3), 1999, 149-155.
85. Pan, T.-M.; Huang, M.-D.; Lin, W.-Y. and Wu, M.-H.; *A urea biosensor based on pH-*

- sensitive Sm<sub>2</sub>TiO<sub>5</sub> electrolyte–insulator–semiconductor. Analytica Chimica Acta*, 669:(1–2), **2010**, 68-74.
86. Bonanni, A. and Del Valle, M.; *Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: A review. Analytica Chimica Acta*, 678:(1), **2010**, 7-17.
  87. Barsoukov, E. and MacDonald, J. R.; *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment and Application*, (Wiley Interscience, New Jersey, 2005).
  88. Skinner, N. G. and Hall, E. A. H.; *The relevance of an equivalent circuit for polyaniline using immittance spectroscopy. Synthetic Metals*, 63:(2), **1994**, 133-145.
  89. Johnson, B. W.; Read, D. C.; Christensen, P.; Hamnett, A. and Armstrong, R. D.; *Impedance characteristics of conducting polythiophene films. Journal of Electroanalytical Chemistry*, 364:(1–2), **1994**, 103-109.
  90. Canevarolo, S. V.; *Técnica de Caracterização de Polímeros*, (São Paulo: Artliber Editora, 2004).
  91. Dedavid, B. A.; Gomes, C. I. and Machado, G.; *Microscopia eletrônica de varredura - aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*, (Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007).
  92. Maliska, A. M.; *Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise. Laboratório de Materiais, Santa Catarina (apostila)*, Disponível em: [http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV\\_Apostila.pdf](http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf).

## APÊNDICE A

### Técnicas eletroanalíticas

A eletroquímica moderna tem sido empregada como uma ferramenta poderosa para estudar processos tecnológicos em uma variedade de campos de pesquisa, incluindo biotecnologia, eletrônica e ciência dos materiais. Dos muitos métodos eletroquímicos disponíveis, a voltametria, nas suas diversas formas, é talvez a técnica mais versátil e efetiva para estudar sistemas redox, além de ser bastante útil em eletroanálise<sup>78</sup>.

Nas últimas décadas, os métodos eletroanalíticos têm sido propostos como alternativas viáveis e promissoras. Eles têm despertado grande interesse devido ao seu baixo custo e, principalmente, por possibilitar o uso de eletrodos quimicamente modificados. Estes eletrodos podem promover uma maior sensibilidade, aplicabilidade e estabilidade para o sistema em estudo, frente aos eletrodos não modificados<sup>79,80</sup>.

Quando as técnicas eletroquímicas foram desenvolvidas, eram baseadas em eletrodos de trabalho de mercúrio. Como o mercúrio é um metal líquido, os sistemas utilizavam medidas em gotas e o eletrodo era conhecido como eletrodo gotejante de mercúrio. Surgia a polarografia, por utilizar mercúrio como eletrodo de trabalho. Com o passar do tempo novos eletrodos surgiram pela necessidade de trabalho em regiões de potencial diferentes da qual o mercúrio atuava. Eletrodos sólidos de platina, ouro e carbono vítreo, grafite são atualmente os mais importantes e usuais<sup>11</sup>.

A caracterização da superfície de um eletrodo é de extrema importância, a fim de se compreender suas estruturas e composição, proporcionando resultados mais eficientes. Sendo assim, a compreensão da estrutura básica da matéria tem se apresentado como um desafio ao longo do tempo, o que permite com que se compreendam as suas propriedades<sup>81</sup>. As técnicas eletroquímicas são bastante utilizadas para se detectar substâncias de interesse por serem relativamente simples e rápidas e por permitir uma análise mais detalhada das reações envolvidas entre substrato-elemento biológico. Como exemplos destas técnicas podem ser citados, a voltametria cíclica, voltametrias de pulso, cronoamperometria e espectroscopia de impedância eletroquímica. Para uma melhor compreensão da morfologia e topografia dos polímeros usados como matriz é utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV)<sup>3</sup>.

Na literatura, os biossensores voltamétricos são muito comuns<sup>22</sup>. Dentre os métodos voltamétricos em eletroquímica, destacam-se a voltametria cíclica e voltametria de pulso

diferencial. A voltametria cíclica, dentre outras funções, é muito utilizada para a modificação dos eletrodos de trabalho com polímeros e sua caracterização.

### ***Voltametria cíclica***

A voltametria é uma técnica onde as informações quantitativas e qualitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas de potencial *versus* corrente, feitas durante uma eletrólise da espécie química em questão contida em uma célula eletroquímica<sup>11</sup>. É uma das técnicas voltamétricas mais usadas para o estudo de espécies eletroativas em solução ou imobilizadas nos eletrodos, que fornece informações importantes do sistema redox<sup>1,82</sup>.

Dentre os métodos conhecidos para estudar os processos de eletrodo, os de varredura de potencial são provavelmente os mais usados<sup>70</sup>. A voltametria cíclica mostra-se particularmente eficiente quando se deseja conhecer a eletroatividade de compostos (especialmente moléculas biológicas), investigar reações químicas acopladas e estudar superfícies de eletrodos. A técnica também fornece informações a respeito da reversibilidade eletroquímica de um sistema, que está associada à troca rápida de elétrons entre as espécies redox e o eletrodo<sup>78</sup>.

O estudo dos mecanismos de reação em solução possibilita detectar intermediários eletroativos tanto para reações relativamente lentas como as rápidas<sup>1</sup>. Consiste na medida das correntes geradas em função de uma dada programação de potenciais imposta a um eletrodo. Os métodos de varredura de potencial consistem na aplicação de um potencial ao eletrodo de trabalho variando continuamente com o tempo o que conduz à ocorrência de reações de oxidação ou redução de espécies eletroativas na solução.

As curvas corrente-potencial, conhecidas por voltamogramas, são obtidas pela variação gradual do potencial aplicado a um eletrodo de trabalho imerso em uma célula eletroquímica contendo a solução de interesse, frente a um eletrodo de referência estável e um eletrodo auxiliar. A forma da perturbação do eletrodo, pela aplicação de diferentes programações de potenciais, define a natureza da técnica voltamétrica<sup>1</sup>.

A voltametria cíclica, apesar de nem sempre fornecer resultados com elevada sensibilidade, permite que se obtenha rapidamente informações sobre um sistema eletroquímico, é uma das técnicas mais utilizadas para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos<sup>29</sup>.

A causa de sua menor sensibilidade (comparada com outras técnicas voltamétricas) é a



variação contínua do potencial aplicado. Ao ser variado o potencial, gera-se corrente capacitiva, que vai se somar à corrente faradáica. Em baixas concentrações de analito, a contribuição da corrente capacitiva se torna significativa e como não pode ser distinguida da faradáica, inviabiliza a análise<sup>29</sup>.

Um voltamograma cíclico indica em que região de potencial determinada reação redox (compostos eletroativos) irá ocorrer. A técnica também fornece outras informações a respeito de um sistema, como: o número de elétrons envolvidos no processo e se ocorre à formação de espécies intermediárias, etc. Para utilização das técnicas voltamétricas, necessita-se de um potenciostato ou galvanostato<sup>29</sup>.

O eletrodo mais importante, onde ocorre a reação de interesse, é o de trabalho, que pode ser constituído de diferentes materiais, dentre os quais, as várias formas de carbono (carbono vítreo, pirolítico, diamante, nanotubos e pó de grafite) e os metais nobres (ouro, platina), que apresentam faixa de trabalho mais ampla. Metais menos nobres (cobre, níquel, cobalto) e outros podem ser utilizados para determinadas aplicações. O eletrodo auxiliar (construído geralmente por material inerte, na maioria das vezes platina) deve ter área superior à do eletrodo de trabalho e tem a função de fornecer a corrente necessária para sustentar a reação. O eletrodo de referência tem o papel de monitorar o potencial aplicado pelo eletrodo de trabalho. Dessa forma, o ER não pode sofrer alterações de potencial resultantes do fluxo de corrente. Nos potenciostatos modernos, a elevada resistência do circuito evita um fluxo de corrente significativo através do eletrodo de referência e a consequente alteração de seu potencial<sup>29</sup>.

Na forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica, o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho, em uma solução sem agitação. Dependendo da informação desejada, simples ou múltiplos ciclos podem ser utilizados<sup>29</sup>.

Os processos redox que acontecem no ET são representados pelos principais parâmetros em um voltamograma cíclico, que são o potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) e catódico ( $E_{pc}$ ), e a corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) e catódica ( $I_{pc}$ ). Para uma reação reversível de eletrodo, as correntes de pico anódico e catódico são aproximadamente iguais em valor absoluto, mas de sinais opostos, e a diferença entre os picos de potenciais para um sistema reversível é  $0,0592/n$ , onde  $n$  é o número de elétrons envolvidos na semi-reação<sup>70,83</sup>.

Entre as várias aplicações da técnica de voltametria cíclica, sua utilização nos estudos envolvendo polímeros condutores é de grande importância, fornecendo vários parâmetros relacionados aos estágios de crescimento, na elucidação do mecanismo redox, além de proporcionar um excelente controle sobre a qualidade dos polímeros<sup>1,84</sup>.

Assim, a voltametria cíclica é uma ferramenta para estudos fundamentais e de diagnóstico, que fornece informações qualitativas sobre mecanismos de reações eletroquímicas e identificação de espécies presentes em solução. No entanto, para um estudo quantitativo é necessário empregar técnicas mais sensíveis como, por exemplo, as técnicas de voltametria de pulso ou de onda quadrada. A voltametria de pulso diferencial é muito utilizada na construção de biossensores<sup>1</sup>.

### ***Voltametria de pulso diferencial***

As voltametrias de pulso diferencial geralmente são mais sensíveis do que a voltametria cíclica, e sensibilidade ainda melhores do que as obtidas por voltametria de pulso normal podem ser obtidas com a voltametria de pulso diferencial. Esta técnica apresenta diferenças com a de pulso normal, tais como o potencial de base aplicado não ser constante. Ao invés disso, muda em pequenos incrementos, a altura do pulso é de apenas 10 a 100 mV. Um nível constante em respeito ao potencial de base é mantido e duas correntes são amostradas. Uma imediatamente antes do pulso e outra antes do fim do pulso e o experimento é obtido como uma diferença entre as duas contra o potencial. O nome da técnica é devido ao processo de diferenças entre as duas correntes. O melhoramento da técnica vem, novamente, da maior redução da contribuição da corrente capacitiva. Os melhoramentos na técnica fornecem sensibilidades em magnitude melhores do que a voltametria de pulso normal. Limites de detecção menores que  $10^{-8}$  mol dm<sup>-3</sup> podem ser alcançados. Esses baixos valores são de interesse, dentre outras aplicações, para detecções de biomoléculas em sensores biológicos, cuja finalidade é a análise de amostras em concentrações baixas para identificação de pequenas quantidades de contaminantes em solo, água e alimentos ou diagnóstico em estágios iniciais de doenças<sup>85</sup>.

### ***Cronoamperometria***

Outra técnica voltamétrica bastante utilizada para estudar reações de eletrodo e suas velocidades é a cronoamperometria. Neste sentido, esta técnica é normalmente empregada para complementar a voltametria cíclica na análise de mecanismos eletroquímicos. A cronoamperometria se baseia na aplicação de um único degrau de potencial, produzindo-se uma corrente que decai rapidamente com o tempo<sup>78</sup>.

A cronoamperometria se constitui em uma técnica vastamente utilizada em

eletroanálise, principalmente em aplicações típicas envolvendo titulações amperométricas, sensores amperométricos e células em fluxo. Medidas amperométricas são muito úteis para avaliar biossensores<sup>29</sup>.

Uma grande vantagem da cronoamperometria é que, comparada com a voltametria cíclica para a quantificação de baixas concentrações de analito, pelo fato de ser uma técnica conduzida a potencial constante, a corrente residual obtida apresenta valores muito baixos<sup>29</sup>. Uma vez que o potencial do eletrodo é mantido em um único valor fixo, a corrente capacitiva (resultante do carregamento da dupla camada elétrica do eletrodo) torna-se constante, virtualmente igual a zero. Isso confere à técnica maior sensibilidade, em relação à voltametria baseada na varredura de potenciais<sup>78</sup>.

A detecção amperométrica baseia-se na medida de uma corrente ( $i$ ) a um potencial ( $E$ ) fixo aplicado, ou seja, um sensor amperométrico mantido num potencial constante. A detecção amperométrica a potencial constante utiliza instrumentação simples e de baixo custo, razão pela qual foi a mais explorada em sistemas para a determinação de uma grande variedade de compostos eletroativos<sup>29</sup>.

Uma das limitações desta técnica é a baixa seletividade. Se a análise é realizada em potenciais extremos (positivos ou negativos), promove-se a oxidação ou a redução de todas as espécies que são eletroativas em potenciais abaixo do valor estabelecido. Portanto, é aconselhável empregar valores mínimos de potencial<sup>78</sup>.

Outra limitação associada à detecção amperométrica está na estabilidade do sinal eletroquímico, quando determinados compostos são analisados, comprometendo a repetibilidade da corrente eletroquímica (sinal eletroquímico) e a reprodutibilidade dos resultados da análise. A estabilidade do sinal eletroquímico é governada pela taxa de transferência de carga (elétron) entre o eletrodo e a espécie eletroativa (presente na interface eletrodo-solução) que, por sua vez, depende das condições da superfície do eletrodo. A superfície do eletrodo pode ser modificada durante a análise, dependendo do tipo de composto que está envolvido no processo eletroquímico. Ou seja, quando a espécie eletroativa ou o produto formado na reação de eletrodo ou ambos são adsorvidos na superfície do eletrodo de modo irreversível ou quase-irreversível, ocorre a contaminação ou a passivação do eletrodo. A passivação ou a contaminação da superfície do eletrodo pode afetar a taxa de transferência de carga entre o eletrodo e o analito, como também pode produzir sinais eletroquímicos devido aos produtos adsorvidos, que interferem no sinal desejado<sup>29</sup>.

Os sensores amperométricos se baseiam em reações de oxidação e redução, que envolvem um determinado analito para medição de suas concentrações. Estas reações geram

um fluxo de corrente entre os eletrodos, a qual, dentro de certas condições, é proporcional à concentração do analito que se deseja mensurar. O controle deliberado da reatividade eletrodo/solução é um dos objetivos básicos da eletroquímica, e tais conhecimentos também são muito relevantes nas áreas de eletrocatalise, eletroanálise e corrosão, entre outras. Para propostas analíticas, sensores obtidos a partir de diversos substratos metálicos são aplicados na determinação de várias substâncias de interesse<sup>29</sup>.

A presença de biomoléculas sobre a superfície de um eletrodo condutor proporciona uma alteração de valores físicos entre eletrodo e solução de medida, como resistência, capacitância e indutância que serão proporcionais à concentração do analito. Dependendo do tipo de material estudado sobre a superfície, pode-se escolher a solução de interesse que seja adequada para se obter essas medidas. Isso normalmente é realizado através de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica<sup>86</sup>.

### ***Espectroscopia de impedância eletroquímica***

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma das técnicas mais poderosas e sensíveis para investigação das propriedades elétricas da superfície de eletrodos modificados. Nos dispositivos impedimétricos, medidas diretas das propriedades elétricas da superfície são monitoradas. A EIE mede a resposta (corrente e sua fase) de um sistema eletroquímico a um potencial de oscilação aplicado em diferentes frequências sobre um potencial d.c.<sup>69,87</sup>.

O princípio da técnica consiste em aplicar uma perturbação senoidal de tensão ao sistema, de pequena amplitude e de frequência  $\omega$ , gerando assim uma corrente AC provocada por um potencial descrito como  $E_{sen}(\omega t)$ , que, de acordo com a Lei de Ohm, origina a impedância,  $Z = [nE_{sen}(\omega t)]/i$ . É possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Uma vez que a perturbação no sistema sob investigação é de pequena amplitude, é possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional<sup>88</sup>. A obtenção de informações a partir dos dados de impedância eletroquímica pode ser conduzida mediante a utilização de diferentes modelos de medida, como circuitos equivalentes ou modelos matemáticos. Assim, tem-se um dos modos mais utilizados para apresentar as medidas de impedância, através do gráfico de Nyquist, no qual se pode observar os valores da parte imaginária da impedância ( $Z''$ ) em função dos valores da parte real ( $Z'$ ).

Um diagrama de Nyquist “ideal” apresenta um semicírculo na região de altas

frequências e uma variação linear em médias e baixas frequências. Na região de altas frequências, o efeito da relaxação de transferência de carga é mostrado através de um semicírculo, do qual se pode obter os valores de  $R_s$  (resistência do eletrólito e eletrodo),  $R_{tc}$  (resistência à transferência de carga) e  $C_{dl}$  (capacitância da dupla camada elétrica)<sup>11</sup>.

Para o tratamento dos dados experimentais de impedância, é atribuído aos resultados um circuito equivalente, que possa simular a resposta AC do sistema eletroquímico. Os componentes do circuito podem ser: resistores que simulam o comportamento resistivo do eletrodo, eletrólito e polímero; capacitores que simulam o comportamento capacitivo das interfaces eletrodo/polímero e polímero/eletrólito; linhas de transmissão que simulam a impedância de difusão iônica, também conhecida como impedância de Warburg (W); elementos de fase constante (EFC) e elementos de difusão (T)<sup>89</sup>.

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Em muitos campos da Química, Ciência dos Materiais, Geologia e Biologia, um conhecimento específico sobre a natureza das superfícies de sólidos é de grande importância. Assim, para se realizar uma análise mais completa dos materiais, é necessário que se faça uma análise da imagem de sua superfície, que nos dá informações a respeito de suas propriedades, bem como de sua microestrutura e defeitos<sup>3</sup>.

Desta forma, uma das técnicas mais empregadas para a caracterização de materiais é a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Essa técnica permite estudar as características morfológicas e topográficas de diferentes superfícies<sup>2</sup>, produzindo imagens de alta resolução, sem a perda de nitidez. A preparação de amostra e a obtenção das imagens são relativamente simples, o que faz esta técnica ser uma das técnicas mais utilizadas em pesquisas com materiais<sup>90</sup>. A MEV se apresenta como a técnica mais adequada para uma análise mais detalhada de morfologia, pois se podem alcançar aumentos superiores ao da microscopia óptica. Em análises de materiais, o aumento é da ordem de 10.000 vezes ou superior<sup>3</sup>.

O microscópio eletrônico de varredura é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise das características microestruturais, fornecendo rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida. A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que for muito pequeno para tal. Ele possui as características essenciais necessárias a um microscópio de alta resolução. Como resultado tem-se que os aparelhos modernos permitem aumentos de 300.000 vezes ou mais, para a maior parte de materiais sólidos, conservando a

profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas<sup>91</sup>.

Uma característica importante do microscópio eletrônico de varredura é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica<sup>91</sup>.

O MEV tem seu potencial ainda mais desenvolvido com a adaptação na câmara da amostra de detectores de raios-X permitindo a realização de análise química na amostra em observação. Através da captação pelos detectores e da análise dos raios-X característicos emitidos pela amostra, resultado da interação dos elétrons primários com a superfície, é possível obter informações qualitativas e quantitativas da composição da amostra na região submicrométrica de incidência do feixe de elétrons. Este procedimento facilita a identificação de precipitados e mesmo de variações de composição química dentro de um grão. Atualmente quase todos os microscópios eletrônicos de varredura são equipados com detectores de raios-X, sendo que devido à confiabilidade e principalmente devido à facilidade de operação, a grande maioria faz uso do detector de energia dispersiva (EDX)<sup>92</sup>.